

REINIGUNG
UND CHARAKTERISIERUNG
DES NUKLEARFAKTORS I
AUS DER LEBER
VON SUS SCROFA DOMESTICUS

Irene Gander

Disbui. München

1988

**REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES NUKLEARFAKTORS I AUS
DER LEBER VON SUS SCROFA DOMESTICUS**

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Irene Gander**

aus Hamburg

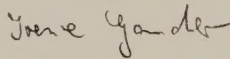
**im
April 1988**

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von 12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Prof.Dr. E.-L. Winnacker betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
München, am 20.4.1988



Irene Gander

Dissertation eingereicht am 20.4.1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. July 1988

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

R. Schneider, I. Gander, U. Müller, R. Mertz und E.-L. Winnacker (1986). A sensitive and rapid gelretention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nucleic Acids Res.* 14, 1303-1317.

R. Schneider, T. Dörper, I. Gander, R. Mertz und E.-L. Winnacker (1986). A Sensitive and Rapid Assay for DNA-binding Proteins Exemplified by a Functional Analysis of the Inverted Terminal Repetition of Adenovirus DNA. *Cancer cells 4, DNA tumor viruses*, Cold Spring Harbor Laboratories, 477-483.

M. Meisterernst, I. Gander, L. Rogge und E.-L. Winnacker (1988). A quantitative analysis of nuclear factor I DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, in press.

Die vorliegende Arbeit entstand während der Zeit vom August 1984 bis Dezember 1987 am Institut für Biochemie der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker. Ihm möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ. Von großer Wichtigkeit war für mich die Teilnahme an internationalen Meetings, die er mir ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau R. Foeckler, die sich durch ihre wertvolle Mitarbeit als große Hilfe erwies.

Ebenso danke ich Herrn L. Rogge, Herrn M. Meisterernst, Herrn T. Wilnow und Frau C. Donath für die sehr gute Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Lottspeich vom Genzentrum München danke ich für die Sequenzierung der Peptide.

Für die Durchführung der Serumtests gilt mein Dank Frau C. Fischer vom Genzentrum München.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Mertz vom Genzentrum München für die Synthese von Oligonukleotiden bedanken.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker, Frau Dr. I. Kruczek, Herrn Dr. M. Lipp, Frau S. Garbrecht und Herrn M. Meisterernst.

Ferner sei allen meinen Kolleginnen und Kollegen in unserem Labor, die ich hier nicht namentlich aufgeführt habe, mein Dank gesagt für ihre guten Ratschläge und das angenehme Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Adenoviren, DNA Replikation	1
1.2. Die NF I Bindestelle	3
1.3. Mögliche Funktion von NF I in eukaryontischen Zellen	4
1.4. Die Familie der CCAAT-bindenden Proteine	6
1.5. Reinigung von DNA bindenden Proteinen	8
1.6. Reinigung von NF I aus HeLa Zellen	10
1.7. Ziel der Arbeit	10
2. MATERIAL	11
2.1. Schweineleber	11
2.2. Oligonukleotide	11
2.3. Bakterien und Plasmide	11
2.4. Enzyme	11
2.5. Chromatographie Geräte und Säulen	11
2.6. Chemikalien und sonstige Materialien	12
3. METHODEN	14
3.1. Isolierung der Zellkerne aus Schweineleber	14
3.2. Extraktion der Zellkerne	15
3.3. Proteinreinigung-Säulenchromatographie	16
3.3.1. DEAE Chromatographie	16
3.3.2. Mono Q Chromatographie	16
3.3.3. Mono S Chromatographie	17
3.3.4. Superose Gelfiltration	17
3.3.5. Phenyl-Superose	17
3.3.6. Mono P-Chromatofocussierung	17
3.3.7. Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie	18

3.4.	Konstruktion der Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie-Säule	18
3.4.1.	Vorbereitung der Oligonukleotide	18
3.4.2.	Bromcyan Aktivierung der Sepharose	19
3.4.3.	Kopplung der DNA an bromcyan-aktivierte Sepharose	19
3.5.	Konzentrierung von Proteinlösungen	19
3.6.	Reinigung von Oligonukleotiden	20
3.6.1.	Reinigung über Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	20
3.6.2.	Reinigung von Oligonukleotiden über Sephadex G 50	21
3.7.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	22
3.7.1.	Proteinbestimmung nach Warburg	22
3.7.2.	Bestimmung mit dem Biorad Assay kit	22
3.8.	Auftrennung von Proteinen auf denaturierenden Polyacrylamid-gelen	23
3.8.1.	SDS-Gelelektrophorese	23
3.8.2.	SDS Harnstoff Gelelektrophorese	24
3.8.3.	Färbemethoden für Proteine in denaturierenden Polyacrylamid-gelen	24
3.8.3.1.	Coomassie Färbung	24
3.8.3.2.	Silberfärbung	25
3.9.	Immunologische Methoden	26
3.9.1.	Immunsisierung	26
3.9.2.	Westernblot	26
3.10.	Enzymatische Reaktionen an DNA	28
3.10.1.	Reinigung und Konzentrierung von DNA	28
3.10.2.	Restriktionsverdau von DNA	28
3.10.3.	Phosphatasebehandlung	28
3.10.4.	Phosphorylierung von DNA	29
3.10.4.1.	Phosphorylierung der Oligonukleotide für die Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie	29
3.10.4.2.	Radioaktive Markierung von DNA mit $\gamma^{32}\text{P}$ dATP	30
3.10.5.	Ligasereaktion	30
3.11.	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	32
3.11.1.	Agarose Gelelektrophorese	32
3.11.2.	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	32
3.12.	Plasmidisolierung	33
3.13.	Der Gelretentionstest	34

3.13.1.	Analyse von Protein DNA Komplexen in nicht denaturierenden Gelen	34
3.13.2.	Quantifizierung von NF I	35
3.13.3.	Präparative Gelretention	36
3.14.	Gewinnung von denaturiertem und nativem Protein nach der präparativen Gelretention	36
3.14.1.	Gewinnung von denaturiertem Protein	37
3.14.2.	Gewinnung von nativem Protein	37
3.15.	DNase I Footprint	37
3.16.	Erzeugung von Proteinfragmenten	39
3.16.1.	Trypsin Verdau	39
3.16.2.	V8 Verdau	39
3.16.3.	Bromcyanspaltung	39
3.17.	Auftrennung von Peptiden	40
3.18.	South Western Verfahren zur Durchmusterung von Expressions-cDNA-Banken	41
3.19.	Präparation von Bakterienlysaten	42
3.20.	Reinigung von DNA bindenden Proteinen aus Bakterienlysaten	42
4.	ERGEBNISSE	44
4.1.	Charakterisierung der DNA Bindung von NF I im Rohextrakt	44
4.1.1.	Der Gelretentionstest	45
4.1.2.	Salzabhängigkeit der Bindung	46
4.1.3.	pH Abhängigkeit der Bindung	46
4.1.4.	Spezifität der Bindung	48
4.1.5.	Test auf Einzelstangbindung	49
4.1.6.	Dissoziierbarkeit der Bindung	50
4.2.	Reinigung von NF I	51
4.2.1.	DEAE Anionenaustausch-Chromatographie	52
4.2.2.	Mono Q Anionenaustausch-Chromatographie (FPLC)	53
4.2.3.	Mono S Kationenaustausch-Chromatographie (FPLC)	53
4.2.4.	Superose Gelchromatographie (FPLC)	56
4.2.5.	Phenylsuperose	56



IV

4.2.6.	Mono P Chromatofokussierung	59
4.2.7.	Präparative Gelretention	59
4.2.7.a.	Analyse des Molekulargewichts nach der präparativen Gelretention	60
4.2.7.b.	Gewinnung von hochreinem nativem NF I nach der präparativen Gelretention	63
4.2.8.	Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie	64
4.2.9.	Zusammenfassung der Reinigung von NF I	67
4.2.10.	Westernblots mit NF I Antiserum	69
4.2.11.	Analyse der DNA Bindung mit hochreinem NF I	70
4.2.11.1.	Spezifität der Bindung	70
4.2.11.2.	DNase I Footprint Analyse	71
4.2.11.3.	Proteasebehandlung von hochgereinigtem NF I	73
4.3.	Peptiderzeugung, Auftrennung und Sequenzierungsergebnisse	74
4.4.	Ansatz zur Klonierung	78
4.4.1.	Durchmusterung von cDNA-Banken	78
4.4.2.	Test der Fusionsproteine im Gelretentionsassay	79
5.	DISKUSSION	81
6.	ZUSAMMENFASSUNG	90
7.	ANHANG	91
	Verzeichnis verwendeter Oligonukleotide	91
8.	LITERATUR	92

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Ad2,Ad5	Adenovirus Typ 2 bzw. 5
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad in Celsius
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bequerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithiotreit
DTT	Dithiotreititol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
Fig.	Figur
fmol	Femtomol
FPLC	Fast Protein, Polypeptide and Polynucleotide Liquid Chromatography
HEPES	(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ITR	invertierte terminale Repetition
kd	Kilodalton
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NF I	Nuklear Faktor I
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Pbs-d	Phosphat gepufferte Salzlösung
pmol	Pikomol

PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND FIGUREN

Tab.1.1.	NF I Bindestellen	6
Tab.4.1.	Retentionsvolumina der Eichproteine bei der Superose-Gel-chromatographie	56
Tab.4.2.	Anreicherungsschema für NF I	68
Tab.4.3.	Liste der ansequenzierten Peptide	75
Tab.5.1.	Partieller Sequenzvergleich von CTF und NF I	88
Fig.1.1.	Adenovirus ITR	2
Fig.1.2.	Die NF I-Erkennungssequenz aus dem Ad2 ITR	3
Fig.1.3.	Modell der Protein-DNA-Interaktion von Proteinen mit Helix turn Helix Bindungsdomänen	4
Fig.3.1.	Fertige Kernpräparation	15
Fig.3.2.	Reinigung von Oligonukleotiden über Sephadex G 50	22
Fig.3.3.	Ligierung von Oligonukleotiden zu Oligomeren	31
Fig.4.1.	Sequenz der für die Gelretention eingesetzten Oligonukleotide	44
Fig.4.2.	Gelretentionstest	45
Fig.4.3.	Salz- und pH- Abhängigkeit der DNA-Bindung von NF I	47
Fig.4.4.	Kompetitions-gel	48
Fig.4.5.	Einzelstrangbindung	49
Fig.4.6.	Dissoziierbarkeit des NF I-DNA-Komplexes	50
Fig.4.7.	Flußdiagramm der Reinigung von NF I aus Schweineleber	52
Fig.4.8.	Mono Q Chromatographie	54

Fig.4.9.	Mono S Chromatographie	55
Fig.4.10.	Superose Gelchromatographie	57
Fig.4.11.	Phenylsuperose Chromatographie	58
Fig.4.12.	Präparative Gelretention	60
Fig.4.13.	Molekulargewichtsbestimmung von NF I nach der präparativen Gelretention	61
Fig.4.14.	Zeitverlauf der Elution der NF I-Bindeaktivität	63
Fig.4.15.	Gewinnung von DNA-freiem, bindungsfähigem NF I nach der präparativen Gelretention	64
Fig.4.16.	Reinigung von NF I über Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie	66
Fig.4.17.	Westernblot mit NF I-Antiserum	69
Fig.4.18.	Kompetitionstest	70
Fig.4.19.	DNase I Footprint mit reinem NF I	72
Fig.4.20.	Proteasebehandlung von NF I unter nativen Bedingungen	73
Fig.4.21.	Trypsinspaltung von NF I	75
Fig.4.22.	Auftrennung der NF I Bromcyan-Spaltfragmente	76
Fig.4.23.	Trennung der mit Trypsin verdauten Peaks I und II	77
Fig.4.24.	Durchmusterung von λ gt11 Klonen mit der South Western Technik	78
Fig.4.25.	Test auf Fusionsproteine mit dem Gelretentionstest	79
Fig.5.1.	Darstellung der Hydrophilizität von Peptid D	86
Fig.5.2.	Sequenzvergleich von NF I Peptiden mit Sequenzen aus Datenbanken	87

1. Einleitung

Da die eukaryotische Replikation ein sehr komplexer und noch weitgehend unverstandener Vorgang ist, wurde zunächst versucht, Einblicke, in Replikationsvorgänge an Hand von viralen Modellsystemen zu gewinnen. Es gelang sowohl die DNA des Affenvirus SV40 (Li und Kelly, 1984) als auch die des Menschen infizierenden Adenovirus Ad2 (Übersichtsartikel: Challberg und Kelly, 1982; Stillman, 1983) *in vitro* zu replizieren. Neben viralen Proteinen konnten zelluläre Faktoren identifiziert werden, die am Replikationsprozess beteiligt sind. Dabei wurde Nuklearfaktor I (NF I) als erstes zelluläres Protein beschrieben, welches für die Adenovirus Replikation essentiell ist (Nagata et al., 1982).

1.1. Adenoviren, DNA-Replikation

(Übersichtsartikel: Fütterer und Winnacker, 1984; DePamphilis, 1988)

Adenoviren sind hüllenlose DNA Viren mit ikosaedraler Struktur. Bisher wurden über 80 verschiedene Serotypen aus dem Respirationstrakt von Säugetieren isoliert (Rowe et al.; 1953; Hilleman und Werner, 1954). Das lineare Genom besteht aus ca. 36 kbp, an dessen 5'-Enden kovalent das Terminale Protein gebunden ist. Die DNA-Enden weisen umgekehrte terminale Repetitionen (ITR) auf. Diese variieren in ihrer Länge zwischen 65- und 165 bp bei den verschiedenen Serotypen und weisen starke Sequenzhomologien auf (Tamanoi und Stillman, 1983; Fütterer und Winnacker, 1984).

Beim Replikationsvorgang verläuft die DNA-Synthese bidirektionell. Der Synthesestart wird durch das sogenannte Proteinpriming (Rekosh et al., 1977) bewerkstelligt: Ein Serinrest des präterminalen 80 kDa Proteins (pTP) reagiert dabei mit dem α Phosphatrest von dCTP in Gegenwart von viruskodierter DNA Polymerase, zellulären Faktoren und Adenovirus DNA. Der entstandene pTP-dCMP Komplex lagert sich an die Matrizen-DNA, das freie 3'OH Ende des dCMP dient als Startgruppe für die DNA-Synthese. Das Protein bleibt kovalent an die DNA gebunden und wird im Verlauf der Infektion zu einem 55 kDa Protein prozessiert. Neben dem präterminalen Protein und der viralen DNA Polymerase ist ein drittes viruskodiertes Protein, das an einzelsträngige DNA bindende 72 kDa Protein (DBP), für die vollständige DNA-Replikation erforderlich (Horwitz et al., 1979).

Aufschlüsse über die DNA-Sequenzen der ITR (Fig. 1.1.), die für die Initiation der Replikation notwendig bzw. förderlich sind, wurden aus Versuchen mit Plasmidkonstrukten gewonnen. Unterschiedlich lange Bereiche der ITR und mutierte

ITR Sequenzen wurden in Plasmide kloniert und die Initiationseffizienz *in vivo* und *in vitro* getestet. Bei der *in vitro* Replikation bilden die ersten 18 bp das minimale Replikon. In diesem Bereich von Position 9 bis 22 liegt die Erkennungssequenz des pTP (Rijnders et al., 1983). Konstrukte, die die ersten 40 bp des ITR beinhalten, zeigen eine 10-fach höhere Initiationseffizienz. Dem zusätzlichen Bereich konnte die sequenzspezifische Interaktion mit dem zellulären Protein NF I zugeordnet werden. Die Bindestelle ist hochkonserviert in vielen Serotypen vorhanden. In den sich anschließenden 11 bp (bis Position 51) wurde die Bindestelle eines weiteren zellulären Faktors, Nuklearfaktor III, lokalisiert (Pruijn et al., 1986). Konstrukte, die diesen Bereich mitbeinhalten, zeigen einen weiteren 3fachen Anstieg der Initiationsrate. Im Gegensatz zu den Replikationsuntersuchungen *in vitro* konnte *in vivo* keine Replikation mit Konstrukten, die nur die ersten 18 bp des ITR enthalten, nachgewiesen werden. Plasmide, die die ersten 45 bp und damit die NF I Bindestelle beinhalten, durchlaufen jedoch mehrere Replikationsrunden (Hay, 1985).

Für die Elongationsreaktion ist neben dem DBP noch ein zelluläres Protein erforderlich, Nuklearfaktor II (NF II). Dieses Protein ist in seiner Funktion durch Topoisomerase I aus HeLa Zellen ersetzbar (Nagata et al., 1983). Ferner stimulieren zwei kleine zelluläre RNA Moleküle die Replikationsreaktion (van der Vliet et al., 1984)

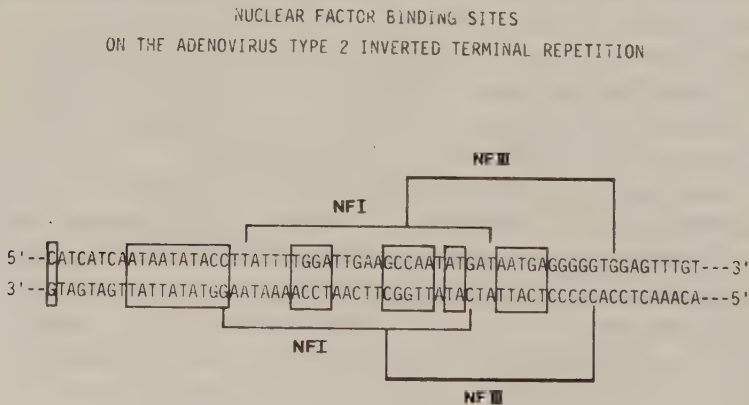


Fig.1.1. Adenovirus ITR. Eingerahmte Basen deuten auf Sequenzen hin, die in vielen Serotypen hochkonserviert enthalten sind. Klammern zeigen die Bereiche, die vor DNase I Abbau durch Bindung von NF I und NF III geschützt sind.

1.2. Die NF I Bindestelle

Bei weitem am besten untersucht wurden bisher die NF I Bindestellen aus der ITR von Adenovirus Typ 2 und 5 (Nagata et al., 1983; Rawlins et al., 1984; Leegwater et al., 1985; de Vries et al., 1987). Fig 1.2. zeigt die Erkennungssequenz und faßt die Daten einer Kontaktpunkt-Analyse zusammen. Die Sequenz ist annähernd rotations-symmetrisch mit der Symmetrieachse bei Position 31. Auf beiden Strängen sind 24 Phosphatbindungen vor DNase I Abbau geschützt. Der "Footprint" weist ebenfalls Symmetrie auf (Fig 1.1.). Durch Verwendung von chemisch modifizierter DNA konnten die Basen und die Phosphatgruppen identifiziert werden die in direktem Kontakt mit NF I stehen (Fig 1.2.). Computer Stereographien ergaben, daß beinahe alle Kontaktpunkte von einer Seite der DNA-Helix zugänglich sind. Die wiederum deutliche Symmetrie der Kontaktstellen läßt die Bindung von NF I als Dimer vermuten. Der Vergleich von anderen viralen und zellulären NF I Bindestellen ergab die folgende Konsensussequenz:

TGGA/CN₅GCCAA

Gerichtete Mutagenesestudien zeigten, daß Veränderungen an der Konsensussequenz die Bindung stören oder unmöglich machen. Benachbarte Sequenzen modulieren die Bindeaffinität (De Vries et al., 1985; Leegwater et al., 1985; Schneider et al., 1986; Rosenfeld et al., 1987)).

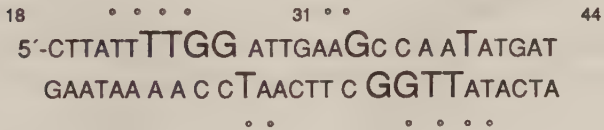


Fig.1.2. Die NF I Erkennungssequenz aus dem Ad2 ITR. Große Buchstaben kennzeichnen Basen die mit NF I in Kontakt stehen. Das Symbol ° deutet Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückrat an (nach de Vries et al., 1987).

Die räumliche Verteilung und Symmetrie der Kontaktpunkte weist große Ähnlichkeit zu einigen prokaryotischen DNA-bindenden Proteinen auf. Wie die Bindestellen dieser Repressor- (λ Repressor, Pabo et al., 1982; cro Protein, Anderson et al., 1981) und Aktivatorproteine (CAP Protein, Simpson, 1980), ist auch die Erkennungssequenz von NF I aus 2 Blöcken von je 5 Basenpaaren, die 4-6 Basenpaare voneinander entfernt und rotationssymmetrisch angeordnet sind, aufgebaut. Inzwischen gelang es einige dieser Proteine allein oder auch zusammen mit ihrer Erkennungssequenz zu kristallisieren und

NMR Analysen anzufertigen (Übersichtsartikel, Takeda et al., 1983). Die Figur 1.3. gibt die Modellvorstellung (hier am Beispiel des λ Repressors), die aus diesen Untersuchungen gewonnen wurde, wieder. Die Faktoren binden als Dimere oder Tetramere an diese Sequenzen, wobei jeweils ein Block mit einem Monomer interagiert. Zwei aufeinander folgende α Helices sind an den Kontakten beteiligt. Die eine Helix, aufgebaut aus 9 Aminosäuren, reicht in die große Furche der DNA hinein und bildet sequenzspezifische Wechselwirkungen aus (in der Abbildung Helix 3). Die zweite α Helix liegt quer über der Furche und tritt vermutlich mit dem DNA-Rückgrat in Kontakt (in der Abbildung Helix 2). Sequenzvergleiche dieser bihelikalen Bindungsdomäne mit der Homoeobox homoeotischer Gene (Übersichtsartikel: Gehring, 1985) legten nahe, daß auch in diesen Proteinen eine solche Struktur verwirklicht ist (Laughon und Scott, 1984). Weitere Hinweise auf die Struktur der NF I Bindungsdomäne können aus der Klonierung und Sequenzierung des NF I Gens erwartet werden.



Fig.1.3. Modell der Protein-DNA-Interaktion von Proteinen mit 'Helix turn Helix' Bindungsdomäne, am Beispiel des λ Repressors. (nach Ptashne, 1988)

1.3. Mögliche Funktionen von NF I in eukaryotischen Zellen.

Obwohl im Genom der Vertebraten inzwischen schon einige NF I Bindestellen charakterisiert worden sind, ist die Funktion von NF I in eukaryotischen Zellen

weiterhin unklar. Bislang gibt es nur einen Hinweis dafür, daß NF I auch hier als Replikationsfaktor dient: Eine experimentelle Analyse zeigte, daß NF I Bindestellen in gleicher Häufigkeit wie Ursprungsorte der Replikation auftreten, nämlich alle 100 bis 200 kb (Gronostajski et al., 1984; Lewin, 1980). Der gleiche Abstand wurde für die Verankerungspunkte der DNA in der Kernmatrix bestimmt (Vogelstein et al., 1980). Nach statistischen Überlegungen ist ein Auftreten der NF I Konsensus Sequenz häufiger, nämlich alle 16 kb zu erwarten (Gronostajski et al., 1985).

Einige der genauer untersuchten NF I Bindestellen sind in Tabelle 1.1. aufgeführt. Auffällig ist, daß die NF I Erkennungssequenzen zumeist mehrere hundert Basenpaare vor dem Startpunkt der RNA Synthese und dabei oft in DNase I hypersensitiven Bereichen lokalisiert sind. Dieser Befund, und die partielle Übereinstimmung der NF I Konsensussequenz mit dem CCAAT Promotorelement (siehe 1.4.), eröffnete die Diskussion um eine mögliche Funktion von NF I als Transkriptionsfaktor. Folgende experimentelle Ergebnisse weisen auf eine solche Funktion hin:

- *In vitro* Transkriptionsversuche zeigten eine Stimulierung der Transkription des α Globingens durch den Zusatz von gereinigtem NF I (Jones et al., 1987).
- Einige NF I Bindestellen, im 5' flankierenden Bereich des Lysozymgens und im "immediate early" Gen (IE Gen) des Cytomegalovirusgenoms, liegen in Bereichen, die nur in transkriptionaktiven Zellen DNase I hypersensitiv sind (Sippel et al., 1985; 1986; Hennighausen, 1987).
- Insertionen von wenigen Basen in die Spacerregion der NF I Bindestelle der MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) terminalen Repetition (LTR) führten zu Erniedrigung der Transkriptionsrate (Miksicek et al., 1987).
- Über eine NF I Erkennungssequenz im Promotor des Typ I Collagens verläuft die Aktivierung der Transkription durch den transformierenden Wachstumsfaktor- β (Rossi et al., 1988). Allerdings ist die NF I Konsensussequenz nur teilweise in diesem Promotor enthalten.

Möglicherweise ist NF I ein multifunktionelles Protein, das in beide Vorgänge, Replikation und Transkription, involviert ist. Für NF III, der auch unter dem Namen "Oktamer bindendes Protein" durch die Bindung an Promotorbereiche verschiedener eukaryotischer Gene, insbesondere Immunglobulingene, bekannt geworden ist, wird eine duale Funktion vermutet (Pruijn et al., 1987).

Weitere generell wirkende Faktoren sind aus der Hefe bekannt: Der Transkriptionsfaktor CP1, der große Ähnlichkeit zu den Transkriptionsfaktoren höherer Eukaryonten USF (Sawadogo und Roeder, 1985) und MLTF (Carthew et al., 1985) aufweist und auch an die Centromer Region bindet (Bram und Kornberg, 1987); ferner die vermutlich multifunktionellen Proteine GRF I und ABF I der Hefe, die durch ihre Interaktion mit der Silencer Region der HMR und HML Gene entdeckt wurden. ABF I bindet unter

anderem auch im Bereich autonom replizierender Sequenzen (ARS), von denen angenommen wird, daß sie die Ursprungsorte der Replikation in der Hefe sind. (Buchman et al., 1988; Shore et al., 1987).

Herkunft	Sequenz	DNaseI Hyp. *	Position**
CMV1	catcaagcTGGCacatgGCCAAtgcatatc		-800 bis -600
CMV2	gaataataTGGCtaatgGCCAAtattgatt		"
CMV3	gtatgcaatTGGCcaataGCCAAtattgatt		"
CMV4	ggtaatgtTGGAcatgaGCCAAtataaatg		"
CMV5	ctctttatTGGCtatatGCCAAtacact		+ 350
Ad5	ccttattttTGGAttgaaGCCAAtatgataa		
Ha ras	atTGGCgcgcaGCCAAtg		- 300
h β globin	atTGGtatgggGCCAAGA		- 200
Ig M	ggaggacaTGGCactggGCCAAtcttcatg	+	1. Intron
c myc	agtctgggTGAaggtatCCAAtccagata	+	- 860
c myc	taaatgccTGAaggcaGCCAAttttaaat	+	-1500
PBR 322	TGGgcgggcgGCCAA		
BS1a Lysozym	tagagaacTGGCaagctGtCAAaaacaaaa	+	- einige kb
BS1b "	tgcactgcTGGCActatGCCAcggcctgct	+	"
BS2 "	tataacctTGGCAatctGCCcAgctgccca	-	"
MMTV LTR	tgttctttTGGaAtctatCCAAGtcttatg	+	- 80
BKV	cttaccctaTGGaAtctatCCAAGtcttatg		enhancer

Tab.1.1. NF I Bindestellen. *Lage der Bindestellen in DNase I Hypersensitiven Bereichen, soweit bekannt. **Relative Positionen zum Startpunkt der Transkription des jeweiligen Gens.

1.4. Die Familie der CCAAT bindenden Proteine

Die NF I Konsensussequenz enthält zum größten Teil die Sequenz CCAAT, die in Promotoren verschiedener eukaryotischer und viraler Gene vorkommt und für deren Transkription erforderlich ist. Zumeist ist das Pentanukleotid ca. 80 Basenpaare

stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription positioniert (Benoist et al., 1980; Efstratiadis et al., 1980; Mellon et al., 1981; Dierks et al., 1983; Mc Knight et al., 1984; Charnay et al., 1985; Myers et al., 1986). Inzwischen wurden von mehreren Arbeitsgruppen aus verschiedenen Quellen Proteine gewonnen, die an diese Sequenz binden.:

1. Ein aus Rattenleber gewonnenes CCAAT bindendes Protein (CBP), das auch an die Enhancer Core Sequenz bindet. (Graves et al., 1986; Johnson et al., 1987)
2. Der aus HeLa Zellen gereinigte CCAAT Transkriptionsfaktor (CTF), von dem vermutet wird, daß er identisch ist mit NF I, gewonnen aus demselben Zelltyp. Für beide gereinigten Faktoren wurde das gleiche Molekulargewicht bestimmt (eine Peptidfamilie von 52- 66 kDa). Beide Faktoren gleichen sich in ihrem chromatographischen Verhalten, ihrer Bindungsspezifität und in ihrer Fähigkeit zur Stimulierung von Transkription und Replikation. Ferner konnte deren immunologische Kreuzreaktivität gezeigt werden. Dagegen unterscheidet sich CTF von CBP in chromatographischem Verhalten und Hitzesensitivität. (Jones et al., 1987)
3. Die aus einer B Zell Lymphomlinie beschriebenen Faktoren NF Y und NF Y*, die an die CCAAT Sequenz der MHC Klasse II Promotoren und respektive an die des Thymidinkinase Promotors binden. Diese Faktoren unterscheiden sich in ihrer Wechselwirkungsweise mit der DNA von CBP und CTF. (Dorn et al., 1987)
4. Der CCAAT bindende Faktor (CBF) und das CBF ersetzende Protein (CDP), gewonnen aus Gastrula und Blastula Extrakten von Seeigeln. Charakterisiert wurden diese Proteine durch ihre Bindung an das Histon H2B Gen. Auch diese Faktoren sollen sich von den anderen CCAAT bindenden Proteinen unterscheiden. (Barberis et al., 1987)
5. Das TGGCA bindende Protein aus Hühnerovidukt. Dieses Protein scheint mit NF I identisch zu sein. (Leegwater et al., 1986)
6. Ein DNA-bindendes Protein, das an die CCAAT Region im Promotor des menschlichen Thymidinkinasegens bindet. Für dieses Protein(e) wurde eine zellzyklus abhängige Interaktion mit seiner Erkennungssequenz festgestellt. Dieses Protein unterscheidet sich von CTF, NF I und CBP in seinem Molekulargewicht (33 kDa). (Knight et al., 1987)
7. Ein weiteres CCAAT bindendes Protein interagiert mit dem menschlichen hsp70 Promotor. (Wu et al., 1987)
8. Ein CCAAT bindendes Protein, das an Maus $\alpha 1$ -Globinpromotor bindet. (Cohen et al., 1986)
9. Zwei weitere Faktoren CP1 und CP2, charakterisiert in HeLa Zellextrakten. Beide Proteine sollen aus zwei Untereinheiten bestehen und unterscheiden sich in

Bindungsspezifität und Methylierungsinterferenz voneinander und von NF I. (Chodosh et al., 1988a)

Das CCAAT Pentanukleotid kann gemäß seinem Vorkommen in niedrigen und höheren Eukaryonten als hochkonserviertes Promotorelement bezeichnet werden. Darauf weist auch eine neue Arbeit hin, die ein CCAAT bindendes Protein aus der Hefe beschreibt (Chodosh et al., 1988b). Ob NF I in die Familie der CCAAT bindenden Proteine einzuordnen ist, ist umstritten. Für NF I aus Schweineleber wurde in einer Untersuchung der Bindekonstanten deutlich, daß dieses Protein um Größenordnungen weniger affin an die CCAAT Sequenz (z.B. des hsp 70 Promotors) als an die NF I Konsensussequenz bindet (Meisterernst et al., 1988). Dies sollte auch nach den Daten der Kontaktpunktanalyse zu erwarten sein (siehe 1.2). Ferner unterscheiden sich CCAAT und NF I Sequenzen von ihrer Lage relativ zum Startpunkt der Transkription der jeweiligen Gene. Anstatt an Position - 80 stromaufwärts des Transkriptionsstarts, treten NF I Konsensussequenzen zumeist mehrere hundert bis tausend Basenpaare stromaufwärts auf (siehe Tabelle 1.1.).

1.5. Reinigung von DNA-bindenden Proteinen

Als sich die Aufgabe stellte, DNA-bindende Proteine zu reinigen, wurde zunächst versucht, dies allein über herkömmliche chromatographische Verfahren und differentielle Ammoniumsulfatfällung zu bewerkstelligen. Als erstes wurden Bakterien- und Bakteriophagen kodierte DNA-bindende Proteine isoliert:

Zur Reinigung des cI Repressors (Ptashne, 1967a) des λ Phagen sowie des 434 Repressors (Pirota und Ptashne, 1969) wurde folgender Trick angewandt. Eine E. coli Bakterienkultur wurde mit UV Licht bestrahlt und anschließend sehr hoch mit Phagen infiziert. Unter diesen Bedingungen ist die Synthese bakterieller Proteine auf ein fünftausendstel reduziert. Unter Zusatz von radioaktiv markierten Aminosäuren wird dagegen als einziges Phagenprotein der jeweilige Repressor stark exprimiert und gleichzeitig markiert. Im Vergleich zu Repressor- Mutanten konnte der Repressor identifiziert werden. Die Reinigung erfolgte über Anionenaustauschchromatographie und konnte durch Radioaktivitätsmessung verfolgt werden. Die spezifische Bindung des λ Repressors an DNA konnte durch Sedimentationsanalysen nachgewiesen werden (Ptashne, 1967b). Als weiterer Test zur DNA-Bindung von Proteinen wurde von Riggs und Bourgeois (1968) der Filterbindungstest für den lac Repressor entwickelt. Diese Methode beruht darauf, daß an Protein gebundene DNA im Gegensatz zu freier DNA an Nitrocellulosefiltern haftet. Der Test wird noch heute zur Charakterisierung und zur

Verfolgung der Reinigung von DNA-bindenden Proteinen häufig angewandt. Das catabolite activator protein (CAP) sowie lac- und cro- Repressor konnten z.T. bis zur Homogenität durch Chromatographie über zwei Ionenaustauscher gereinigt werden (Riggs et al., 1971; Folkmanis et al., 1976; Gilbert und Müller-Hill, 1970). Von Vorteil war dabei, daß E. coli Proteine größtenteils durch Phosphocellulose Säulen hindurchlaufen, während die DNA-bindenden Proteine durch einen Salzgradienten eluiert werden konnten.

Die herkömmlichen chromatographischen Schritte wurden ergänzt durch Reinigungsverfahren, die die DNA-Bindung der Proteine ausnutzen. Inzwischen wurden eine Reihe von DNA Polymerasen und Hormonrezeptoren über Cellulose- oder Agarose Säulen gereinigt, an die kovalent einzelsträngige oder doppelsträngige, unspezifische DNA gekoppelt wurde. DNA-bindende Proteine blieben an der DNA haften und konnten dann mit einem Salzgradienten eluiert werden. (Alberts et al., 1968; Alberts et al., 1971; Arndt- Jovin et al., 1975).

Inzwischen sind einige Methoden entwickelt worden, die zudem die Spezifität der DNA-Wechselwirkung ausnutzen. Eine Verbesserung der Reinigungsprozedur des cro Repressors des λ Phagen wurde von Folkmanis et al. (1976) entwickelt. Vorgereinigte Extrakte wurden über eine Cellulosesäule gegeben, an die λ DNA zuvor gekoppelt worden war. Die Anwendbarkeit sequenzspezifischer Affinitätschromatographie wurde von Herrick (1980) an Hand des lac Repressors untersucht. Er verglich das Elutionsverhalten des lac Repressors von zwei Sepharosesäulen, an die entweder die Operatorsequenz oder unspezifische DNA gekoppelt worden war. Rosenfeld und Kelly (1986) klonierten Vielfache der Erkennungssequenz von NF I in ein Plasmid und koppelten die Plasmid- DNA dann an Sepharose. In einem anderen Verfahren wurden synthetische Oligonukleotide, die die Erkennungssequenz enthielten, aneinander ligiert, und dann ebenfalls an Sepharose gekoppelt. Es gelang auf diese Weise, die Transkriptionsfaktoren SP 1 und CTF zu reinigen (1980; Kadonaga et al., 1986; Jones et al., 1987). Chodosh und Mitarbeiter markierten sequenzspezifische Oligonukleotide mit Biotin gekoppelten Nukleotiden. Extrakte wurden mit diesen DNA-Fragmenten inkubiert und dann auf eine Säule aufgetragen, die Streptavidin gekoppelte Agarose enthielt. Durch die hohe Affinität von Biotin zum Streptavidin bleiben die Protein- DNA-Komplexe an der Säulenmatrix haften. Das Protein kann anschließend mit Salz eluiert werden (Chodosh et al., 1986). In der vorliegenden Arbeit konnte ein weiteres Verfahren hinzugefügt werden, die Präparative Gelretention (Gander et al., in Vorbereitung).

1.6. Reinigung von NF I aus HeLa Zellen

Alle bisherigen Versuche NF I zu reinigen gingen von HeLa Zellen als Ausgangsmaterial aus. Von vier verschiedenen Arbeitsgruppen wurden dabei drei verschiedene Molekulargewichte bzw Molekulargewichtsbereiche für NF I beschrieben. Den Anfang machten Nagata et al. (1982) mit einer Anreicherung dieses Proteins durch Ionenaustauschchromatographie und Chromatographie über unspezifische DNA-Cellulose. Diese Methode resultierte in einem 47 kDa Protein, beurteilt nach dessen Laufverhalten in SDS Gelelektrophorese und Gelchromatographie. Die Reinigung über eine Cellulosesäule, an welche Plasmide, die Vielfache der NF I Erkennungssequenz trugen, gekoppelt worden waren zeigte, auch nach anschließender Glycerin-gradientenzentrifugation, eine Peptidfamilie von 52-66 kDa sowie ein 32 kDa Protein (Rosenfeld und Kelly, 1986). Nach V8 Proteaseverdau weisen die Polypeptide z.T. ein identisches Spaltungsmuster auf. Ein ähnliches Resultat erhielten Jones et al. (1987) durch Reinigung über eine DNA-Affinitätssäule, die ligierte Oligonukleotide mit NF I Erkennungssequenzen trug. Auch hier dominierte eine Polypeptidfamilie von 52-66 kDa, die ferner identisch zum Reinigungsprodukt der gleichen Extrakte über eine entsprechend Säule mit dem CCAAT Motiv zu sein scheint. Die Reinigung von NF I durch Diffey und Stillman (1986), die methodisch ähnlich zu der von Rosenfeld und Kelly durchgeführt wurde, resultierte in einem 160 kDa Protein.

Alle Gruppen gaben an, daß das Reinigungsendprodukt sowohl in der Lage ist spezifisch an DNA zu binden als auch die Adenovirusreplikation *in vitro* zu stimulieren. Erst die Klonierung des NF I Gens wird die Frage nach der tatsächlichen Größe von NF I endgültig klären.

1.7. Ziel der Arbeit

Zunächst sollte NF I auf seine DNA-Bindung hin im Rohextrakt aus Schweineleberkernen analysiert werden. Anschließend sollte eine Strategie entwickelt werden, um NF I aus Schweineleber zu reinigen. Diese Methodik sollte dann im präparativen Maßstab angewandt werden, um NF I in ausreichender Menge für die partielle Sequenzierung des Proteins zu erhalten. Die Arbeit sollte damit die Voraussetzung liefern für die Suche nach dem NF I Gen.

NF I sollte ferner biochemisch charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wird ein erster Klonierungsansatz gezeigt.

2. Material

2.1. Schweinelebern

Die Schweinelebern wurden schlachtfrisch vom Schlachthof München bezogen.

2.2. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von R. Mertz synthetisiert.

2.3. Bakterien und Plasmide

Das Plasmid PCMS wurde im *E.coli* Stamm gezogen. Mit dem Expressionsvektor λ gt11 wurden Bakterien des Stamms *E. coli* Y 1090 infiziert. Vektoren und Stämme wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. Winnacker zur Verfügung gestellt.

2.4. Enzyme

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

alkalische Phosphatase, T 4 DNA Ligase, Trypsin, V 8 Protease, Arg C Protease, Collagenase

New England Biolabs, Schwalbach:

T 4 Polynukleotidkinase, T 4 DNA Ligase, Restriktionsenzyme

2.5. Chromatographie Geräte und Säulen

Pharmacia/ LKB:

FPLC Anlage, Säulentypen: Mono Q HR 10/ 10 und 16/ 10; Mono S HR 10/ 10; Phenylsuperose HR 5/ 5; Superose 6 HR 10/ 30, Mono P HR 5/ 20; TSK 2000 SWG. HPLC Anlage, Säulentyp: Lichrospher-Säule. Pumpen: High precision pump P-500. Fraktionskollektor FRAC-100. Schreiber: REC 481. UV Meßgerät: UV-1 Contoller: LCC 500.

MZ Analystechnik:

MZ Mikro-Säule.

Applied Biosystems:

Aquapore Säule

2.6. Chemikalien und sonstige Materialien

O. Aldag, Hamburg

NZ Amine A

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:

γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol)

α ³²P-dATP (3000 Ci/mmol)

J.T.Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid, Glycerin

Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg:

Agarose

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

ATP, Chloramphenicol, poly dIdC

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Yeast Extract

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Chloroform, Formamid, Aminoacetonitril-hydrogensulfat

Kodak Limited:

Röntgenfilme XAR5

E.Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Ammoniumperoxidisulfat, Bromphosphorblau, Coomassie Brilliantblau, Dimethylformamid, Essigsäure p.A., Ethanol p.A., Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraacetat, Formamid, Formaldehyd, Glycin, HEPES, Harnstoff, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol p.A., Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat, Phenol, Salzsäure p.A., Tetramethylethylendiamin, Trichloressigsäure, Xylencyanol

Nunc GmbH, Wiesbaden

Petrischalen

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Sephadex G50 fine, Sepharose CL 2B

C.Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol

Schleicher und Schuell, Dassel

Nitrocellulosefilter

Serva, Heidelberg:

Acrylamid, Glaswatte, 2-Mercaptoethanol, N,N'-Methylenbisacrylamid, Visking-Dialysesschläuche

Sigma Chemie, München:

Rinderserumalbumin, Spermidin, Tris-Base

Tetenal Photowerk, 2000 Norderstedt

Tetenal, Abschwächer nach Farmer

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:

3 MM-Papier, Anionenaustauscher DE-52

Zinsser, Frankfurt:

Quickszint-501

3. Methoden

3.1 Isolierung der Zellkerne aus Schweineleber

Für eine Präparation wurden 3 Schweinelebern vom Schlachthof bezogen und sofort auf Eis gekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Lebern wurden zunächst in kleine Stücke zerteilt und das Bindegewebe grob entfernt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte im Waring-Blender in 3 Intervallen von 30-45 Sekunden bei 110 Volt. Da zu langes Bearbeiten mit diesem Gerät Kernlyse zur Folge hat, wurden nach jedem Intervall Proben unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Das Homogenat jeweils einer Leber wurde in 1,5 l Lösung 1 aufgenommen und noch intakte Zellen mit Hilfe eines Handrührgeräts (Zauberstab, ESGE AG, Mettlen, Schweiz) aufgebrochen. Das Homogenat wurde dann durch ein Sieb gepresst, wodurch Bindegewebsreste entfernt wurden. Bei der nun folgenden Zentrifugation (1200 Upm, 45 min, Hereaus Christ Cryofuge H6-6) in 1 l Bechern wurden die Zelltrümmer entfernt. Das Pellet wurde in insgesamt 3 l Lösung 2 gelöst, auf Zentrifugenbecher verteilt und mit einem gleichen Volumen Lösung 1 unterschichtet. Bei der Zentrifugation (60 min, 1800 Upm) durch dieses Sukrosekissen pellettieren die Kerne. Der Niederschlag wurde in 3,5 Volumen Lösung 3 aufgenommen, mit dem Rührstab homogenisiert und auf 250 ml Stahlbecher verteilt. Nach der Zentrifugation (60 min, 16000 Upm, WKF Zentrifuge) wurde das hellbraune Kernpellet erneut in Lösung 3 gelöst und auf einen Sukrosegehalt von 2 M eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zuvor.

Die Kerne wurden anschließend 2 x mit Waschpuffer gewaschen (30 min, 12000 Upm, GSA Becher, Sorvall Zentrifuge) und die Kernzahl dann unter dem Mikroskop in einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Es wurden von 3 Lebern zwischen 5×10^{10} und 2×10^{11} Kerne isoliert.

Lösung 1: 330 mM Sukrose
4 mM CaCl_2

Lösung 2: 240 mM Sukrose
3 mM CaCl_2

Lösung 3: 2,4 M Sukrose
3 mM CaCl_2

Waschpuffer: 240 mM Sukrose
3 mM CaCl_2
25 mM HEPES/ NaOH,
pH 7,5

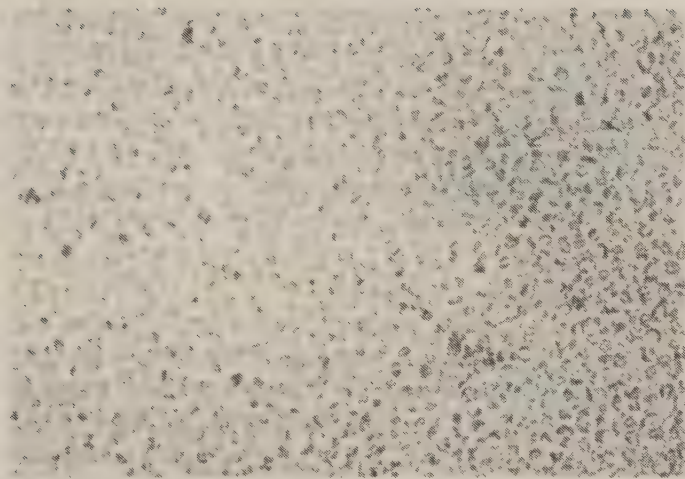


Fig. 3.1. Fertige Kernpräparation, unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

3.2. Extraktion der Zellkerne

Die Kerne wurden in 300-500 ml Lysepuffer 1 aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und 60 min mit 60 Upm geschüttelt. Der Kernextrakt wurde dann durch Zentrifugation (30 min, 12000 Upm, GSA Rotor, Sorvall Zentrifuge) erhalten. Das Kernpellet konnte in 200 ml Lysepuffer 2 nachextrahiert (3 Stunden lang unter den gleichen Bedingungen wie zuvor) werden. Die Dialyse der Extrakte erfolgte über Nacht, gegen ein 10-faches Volumen von Puffer A .

Lysispuffer 1:	240 mM Sukrose	Lysispuffer 2:	240 mM Sukrose
	200 mM NaCl		315 mM Ammonium-sulfat
	1 mM DTT		1 mM DTT
	3 mM CaCl ₂		25 mM Hepes/NaOH, pH 7,5
	25 mM Hepes/NaOH, pH 7,5		3 mM CaCl ₂

3.3. Proteinreinigung-Säulenchromatographie

Alle Chromatographieschritte wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 254 nm verfolgt. Bis auf die DEAE Säule waren dabei alle Säulen an das FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen. Dadurch konnte die Trennung teilweise automatisiert werden. Alle Puffer wurden dafür durch 0,2 µm Filter filtriert und die Proben abzentrifugiert (30 min, 20000 Upm, SS34 Rotor, Sorvall Zentrifuge). Die Fraktionen wurden jeweils auf ihren Gehalt an NF I mit dem Gelretentionstest untersucht.

3.3.1. DEAE Chromatographie

Es wurden 150 ml DE 52 Säulenmaterial (Whatman), wie vom Hersteller beschrieben, vorbereitet und in eine Säule mit 3,3 cm Innendurchmesser eingefüllt. Die Säule wurde dann mehrere Stunden mit Puffer A mit einer Laufgeschwindigkeit von 100 ml/ Stunde äquilibriert. Der dialysierte Kernextrakt wurde dann aufgetragen. NF I spezifische Bindeaktivität wurde mit dem größten Teil des Gesamtproteins durch die Säule hindurchgespült. Diese Säulenchromatographie wurde vor allem zur Abtrennung von Resten zellulärer DNA durchgeführt. Es verblieb allerdings ein Teil der NF I-Aktivität (bis zu einem Drittel der Gesamtaktivität des Rohextraktes) vermutlich über die DNA an die Säule gebunden. Dieser Teil konnte in einem Stufengradienten von 315 mM Ammoniumsulfat in Puffer A mit anderen DNA bindenden Proteinen eluiert werden. Der Durchlauf konnte sofort, das Ammoniumsulfateluat nach vorheriger Dialyse gegen Puffer A auf die Mono Q Säule aufgetragen werden.

3.3.2. Mono Q Chromatographie

Diese starken Anionenaustauschersäulen (geladene Gruppen $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) wurden fertig gepackt vom Hersteller (Pharmacia) bezogen. Je nach Größe der Säule (HR 10/10 oder HR 16/10) konnten 200 bzw. 500 mg Gesamtprotein aufgetragen werden. Es wurden 30 bzw. 120 ml lineare Gradienten von 100 mM bis 1 M NaCl in Puffer A angelegt. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1 bzw. 3 ml/ min und das Fraktionsvolumen 1 bzw. 2 ml. NF I spezifische DNA-Bindeaktivität eluierte zwischen 150- und 300 mM NaCl. Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden gegen den Startpuffer der folgenden Chromatographie dialysiert.

3.3.3. Mono S Chromatographie

Die Mono S Säule des FPLC-Systems (Typ HR 10/ 10) ist ein starker Kationenaustauscher (geladene Gruppen $-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$). Diese Säule hat eine Kapazität von 100-bis 200 mg Gesamtprotein. Sie mußte nach jedem Lauf vollständig regeneriert werden. Die Trennung wurde in Puffer B mit einer Flußrate von 1 ml/ min durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-bis 1 M NaCl. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. NF I eluierte zwischen 550- und 700 mM NaCl. Die Fraktionen wurden sofort nach der Trennung gegen Puffer A dialysiert.

3.3.4. Superose Gelfiltration

Die Superose 6 Säule (HR 10/ 30) trennt optimal im Molekulargewichtsbereich von 5×10^3 bis 5×10^6 bei einer Ausschlußgrenze von 4×10^7 d. Die Proben mußten vor dem Auftragen wie unter 3.3 beschrieben auf ein maximales Volumen von 200- bis 500 µl eingeeengt werden. Es wurden 5 bis 10 mg Protein aufgetragen. Die Flußrate betrug 0,2 ml/ min, die Fraktionsgröße 1 ml.

3.3.5. Phenyl-Superose

Dieser Säulentyp bewirkt die Trennung von Proteinen nach ihrer Hydrophobizität. Ein linearer, absteigender Gradient von 1,7 bis 0 M Ammoniumsulfat in Puffer D wurde angelegt. Die Flußrate betrug 0.2 ml/ min, die Fraktionsgröße wurde auf 1 ml festgelegt. NF I eluierte zwischen 500- und 100 mM Ammoniumsulfat.

3.3.6. Mono P-Chromatofokussierung

Auf diesem Säulentyp können Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden. Es wird ein pH Gradient innerhalb der Säule erstellt. In diesem Fall wurde im pH Bereich von 6.0-9,3 gearbeitet. Als Äquilibrierungs- und Startpuffer wurde 75 mM Tris pH 9,3 verwendet. Eluiert wurde mit 20 ml 1/10 verdünntem 'Polybuffer 96', pH 6,0 (Pharmacia). Bei einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/ min wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.

3.3.7. Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie

Bei diesem Säulentyp handelt es sich um eine Sepharosematrix, an die nach Bromcyan-Aktivierung Oligonukleotide mit der Erkennungssequenz von NF I gekoppelt wurden. Die über die Mono Q Säule vorgereinigte NF I Fraktion wurde bei einer Flußrate von 0,2 ml/ min auf die für NF I spezifische Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. (Konstruktion der Säule siehe 4.3). Als Laufpuffer diente Puffer C. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Puffer C, der zusätzlich 500 mM KCl enthielt gespült. Die Elution geschah mit einem linearen Gradient von 500 mM bis 2,5 M KCl. Das Fraktionsvolumen betrug 2 ml. Die NF I spezifische Bindeaktivität eluierte zwischen 1,8 M und 2,5 M KCl.

3.4. Konstruktion der Erkennungssequenz-Affinitätschromatographiesäule

Das Prinzip: Ein DNA-Fragment mit der Erkennungssequenz eines spezifisch DNA-bindenden Proteins wird an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt. Faktoren, die die Sequenz erkennen, bleiben an der DNA dann haften, während alle anderen Proteine, und bei Zusatz von Kompetitor-DNA, auch unspezifisch DNA-bindende Faktoren, durchlaufen. Ein Salzgradient wird angelegt. Wenn die Salzkonzentration erreicht ist, die die Protein-DNA-Interaktion aufhebt, eluiert das Protein. Die Konstruktion der Säule erfolgte im Prinzip nach der Methode von Kadonaga und Tjian (1986).

3.4.1. Vorbereitung der Oligonukleotide

Ca. 400 nmol der synthetisch hergestellten Oligonukleotideinzelstränge (Dörper T., 1982) L₁ und L₂ (Sequenz siehe Fig. 3.3.), die die NF I Bindestelle tragen, mußten zunächst wie unter 3.5.2. beschrieben über eine Sephadex G 50 Säule gereinigt werden. Die komplementären Stränge wurden miteinander unter stringenten Bedingungen (3.6.3.) hybridisiert. Nach Phosphorylierung der überhängenden 5'-Oligonukleotidenden (3.10.4.) standen die DNA-Fragmente zur Ligation bereit (3.10.5.). Durch diese Oligomerisierung des Oligonukleotids sind die NF I Bindestellen nach der Kopplung an die Sepharose besser für das Protein zugänglich.

3.4.2. Bromcyan-Aktivierung der Sepharose (nach Poonian, 1971)

Es wurden 40 ml vorgequollener Sepharose CL2B (Pharmacia) mit 800 ml H₂O gewaschen und die Sepharose dann auf 15°C im Wasserbad temperiert. Alle weiteren Arbeiten wurden unter einem Abzug durchgeführt. Nun wurden 40 mmol CNBr in N,N-Dimethylformamid gelöst und innerhalb von 2 min zur Sepharose getropft. Anschließend wurde innerhalb von 10 min 7,2 ml 5 N NaOH zugegeben, bei ständiger Kontrolle des pH Wertes, der dabei nicht über pH 10 ansteigen darf. Zum Reaktionsgemisch kamen nun 400 ml Eiswasser. Die Suspension wurde über eine Glasfritte abfiltriert und das Gel mit 1 l H₂O gewaschen. Ständig mußte darauf geachtet werden, daß die Sepharose niemals austrocknet. Das Gel wurde dann mit 200 ml 1M Phosphatpuffer pH 8 gewaschen und in 20 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 resuspendiert.

3.4.3. Kopplung der DNA an Bromcyan-aktivierte Sepharose

An die Aktivierung der Sepharose mußte unmittelbar die Kopplungsreaktion angeschlossen werden. Dazu wurden die in 700 µl gelösten ligierten Oligonukleotide zur Sepharose gegeben und die Reaktion 16 Stunden lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die Sepharose zuerst mit 800 ml H₂O und dann mit 400 ml 1 M Ethanolamin/ HCl pH 8,0 gewaschen. Verbleibende reaktive Gruppen konnten durch fünfstündige Inkubation in 20 ml 1 M Ethanolamin bei Raumtemperatur inaktiviert werden. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit jeweils 400 ml 0,01 M- und 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8, 1 M KCl, H₂O und Aufbewahrungspuffer gewaschen. In diesem Puffer ist das Material über Wochen bei 4°C und über Monate bei -20°C stabil.

Aufbewahrungspuffer: 0,3 M NaCl
 5 mM EDTA
 0,02 % NaN₃

3.5. Konzentrierung von Proteinlösungen

Hierzu wurde das Diaflo-System von Amicon benutzt. Proteinlösungen konnten in der 10 ml Kammer auf 500 µl und in der 200 ml Kammer auf 5 ml eingengt werden. Die Probe wird durch Stickstoffdruck (4 bar) durch eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa (YM 10, Amicon) gepreßt. Sollte die Probe für das

anschließende Experiment umdialysiert werden, so konnte dies schnell durch Auffüllen mit dem Dialysepuffer und erneutes Einengen geschehen.

3.6. Reinigung von Oligonukleotiden

Zur Abtrennung von Syntheseabbrüchen und zur Reinigung von Oligonukleotiden wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet: Für analytische Untersuchungen wurden die Oligonukleotide über ein Polyacrylamidgel gereinigt. Mußten große Nukleotidmengen gereinigt werden (zur Konstruktion der Affinitätsäule und für die präparative Gelretention), so wurde eine Chromatographie über eine Sephadex G50 Säule durchgeführt.

3.6.1. Reinigung über Polyacrylamid/ Harnstoff-Gele

Es wurden 15 %ige 1,5 mm dicke und 23 cm lange Polyacrylamid Gele gegossen, die 8 M Harnstoff enthielten.

Gelzusammensetzung: 100 g Harnstoff
28,5 g Acrylamid
1,5 g Bisacrylamid
20 ml 10xTBE
0,6 ml 10 %iges Ammoniumperoxodisulfat (APS, gelöst in H_2O)
ad 200 ml mit H_2O

Der Harnstoff wurde bei 60°C im Wasserbad unter leichtem Umschwenken gelöst. Die Lösung wurde dann steril filtriert und das Gel nach Zusatz von 55 µl N,N,N',N'-Tetramethyl-methyldiamin (Temed) sofort gegossen. Nach abgeschlossener Polymerisation (mindestens 3 Stunden) wurde das Gel zur Entfernung von APS 30 min lang bei 500 V vorelektrophoretisiert. Vor dem Auftragen der Proben war es wichtig, die Geltaschen mit H₂O zu spülen. Maximal wurden pro Geltasche 200 µg in Wasser gelöster DNA aufgetragen. Die DNA-Lösung wurde zuvor mit einem gleichen Volumen eines Farbstoffgemisches (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol) versetzt und 3 min auf 65°C erhitzt. Nach ca. 7 Stunden bei einer Dauerleistung von 20 Watt hatte der Bromphenolblau-Marker das Gelende erreicht und

die Elektrophorese war damit abgeschlossen. Das Gel wurde auf Haushaltsfolie überführt und die DNA über UV-Fluoreszenzlöschung sichtbar gemacht. Dazu mußte das Gel auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, und von oben mit UV Licht (254 nm) bestrahlt werden. Die DNA verhinderte die Fluoreszenz und erzeugte einen als Bande sichtbaren Schatten. Die oberste Bande, die dem Syntheseendprodukt entspricht, wurde mit einem Skalpell herausgelöst. Das Gelstück wurde fein zerkleinert und in eine zugeschmolzene, mit silikonisierter Glaswolle gestopfte 1 ml Eppendorf-Spitze überführt. Die DNA eluierte über Nacht bei 4°C in 500 µl H₂O. Die Spitze wurde nun abgeschnitten und die Lösung in einer Wifug-Tischzentrifuge durch die Glaswolle zentrifugiert. Das Eluat wurde auf 0,3 M Natriumacetat und 10 mM MgCl₂ eingestellt, mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und die DNA über Nacht bei -80° C gefällt. Anschließend wurde die DNA durch 30 minütige Zentrifugation (20000 Upm, SS34 Rotor, Sorvall Zentrifuge, gefällt. Die DNA wurde in 100 µl TE aufgenommen und unter den gleichen Bedingungen nochmal gefällt. Nun wurde die DNA in 500 µl TE gelöst und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die Berechnung wurde für jedes Nukleotid der entsprechende Extinktionskoeffizient eingesetzt und die Konzentration durch Summation errechnet. Extinktionskoeffizienten bei 260 nm für eine Konzentration von 1 µmol/ml:

dT (8,8) dG(11,8) dA(15,0) dC(7,4)

3.6.2. Reinigung von Oligonukleotiden über Sephadex G 50

Für Reinigung im großen Maßstab (über 100 nmol) erwies sich diese Methode als günstig. Vor ihrer Anwendung empfahl es sich jedoch, ein Aliquot auf ein Polyacryamidgel (3.5.1.) aufzutragen. Nur wenn ein Syntheseendprodukt >90 % der DNA darstellte, wurde die Reinigung über Sephadex durchgeführt. Hier ist als Beispiel die Reinigung der Oligonukleotide L₁ und L₂, die zur Konstruktion der Affinitätssäule benutzt wurden (3.3.b.), dargestellt.

Je 400 nmol der einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in je 500 µl H₂O gelöst. Als Säulen eigneten sich 5 ml Spritzen. Diese wurden mit in H₂O aufgeschwämmtem autoklaviertem Sephadex G 50 Material gefüllt. Die Proben wurden dann aufgetragen, mit jeweils 500 µl H₂O gespült und 500 µl Fraktionen gesammelt. Die Absorption bei 260 nm von 1/200 Verdünnungen der Fraktionen wurde bestimmt, die Peakfraktionen (Fraktion 7 bis 11) vereinigt und die DNA gefällt (Fig.3.2.).

Sephadex G 50 Chromatographie

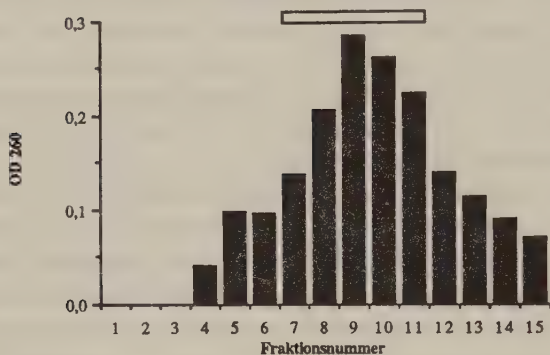


Fig.3.2. Reinigung von Oligonukleotiden über Sephadex G 50. Die OD der Fraktionen bei 260 nm wurde aufgetragen. Der Balken kennzeichnet die Peakfraktionen, die vereinigt wurden.

3.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

3.7.1. Proteinbestimmung nach Warburg

Eine schnelle Abschätzung des Proteingehalts wurde durch die Messung der Extinktion der Lösung bei 260- und 280 nm ermöglicht. Der Proteingehalt konnte mit Hilfe der folgenden Gleichung ermittelt werden:

$$\text{mg Protein/ ml} = 1,45 \times \text{OD}_{280} - 0,74 \times \text{OD}_{260}$$

3.7.2. Bestimmung mit dem Biorad Assay kit

Nach Erstellung einer Eichkurve ist mit dieser Methode die genaue Bestimmung einer Proteinkonzentration möglich. Die Analysen können im Bereich von 0,2 bis 1,4 mg/ ml (Standardmethode) bzw. 1-25 µg/ ml (Mikromethode) durchgeführt werden. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (1976), wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Für die

Eichkurve wurden 2-20 µg Rinderserumalbumin in einem Volumen von 0,8 ml mit 0,2 ml Farblösung (Coomassie Blue, Phosphorsäure, Methanol) gemischt. Nach 5-60 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegenüber dem Leerwert (Proteinpuffer 0,8 ml + 0,2 ml Farblösung) bestimmt. Mit den Proteinproben wurde analog verfahren und die Proteinkonzentration aus der Eichkurve abgelesen.

3.8. Auftrennung von Proteinen auf denaturierenden Polyacrylamidgelen

Diese von Laemmli (1970) entwickelte Methode ermöglicht es, Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen. Der Einfluß unterschiedlicher Oberflächenladung auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine wird dabei durch deren Beladung mit dem stark negativ geladenen Detergenz SDS aufgehoben.

3.8.1. SDS-Gelelektrophorese

Für die 14 cm x 14 cm x 0,75 mm großen 11 %igen Polyacrylamidgelen wurden 20 ml Gellösung benötigt. Die Gelplatten wurden silikonisiert und das Gel nach dem Gießen für 2 Stunden zur Polymerisation bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Entfernung von Ammoniumperoxodisulfat wurde das Gel 30 min bei 100 V vorelektrophoretisiert. Die Proben (0,03 bis 3 µg Protein, je nach Anzahl der zu erwartenden Banden) wurden mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt und 3 min im Wasserbad gekocht. Vor dem Auftragen wurden die Geltaschen 1 x mit Laufpuffer und 1 x mit H₂O gespült. Das Auftragen geschah mit einer Hamilton Spritze. Mit Wasserkühlung konnte die Elektrophorese in 3 Stunden bei konstanter Stromstärke von 23 mA durchgeführt werden.

Laufpuffer:	0,025 M Tris
	0,192 M Glycin
	0,1% SDS
Gellösung:	6,25 ml 44 % Acrylamid, 0,8 % N',N'-Methylenbisacrylamid
	12,5 ml Tris/ HCl 0,75 M, pH 8,8
	0,5 ml 10 %iges SDS
	0,63 ml 1%iges APS
	mit H ₂ O ad 20 ml
	Polymerisationsstart nach Zugabe von 30 µl Temed

Auftragspuffer: 40 % Glycerin
 2,5 % SDS
 5 % β Mercaptoethanol
 100 mM Tris/ HCl, pH 8,8
 0,2 % Bromphenolblau

3.8.2. SDS-Harnstoff-Gelelektrophorese

Sollte die Elektrophorese unter noch stärker denaturierenden Bedingungen und ohne Aufkochen der Probe durchgeführt werden, so wurde diese Methode angewendet. Im Gegensatz zur reinen SDS-Gelelektrophorese enthielt sowohl das Gel als auch der Auftragspuffer 8 M Harnstoff. Für das Gel wurden 5,1 g Harnstoff direkt eingewogen und der Harnstoff in der Gellösung im 60⁰ C Wasserbad gelöst. Die Probe wurde 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Durchführung der Elektrophorese geschah analog zu der unter 3.7.1. beschriebenen Methode.

Auftragspuffer: 8 M Harnstoff
 5 mM Tris/ HCl, pH 8,8
 1 % SDS
 5 % β Mercaptoethanol
 0,2 % Bromphenolblau

3.8.3. Färbemethoden für Proteine in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Diese Methoden wurden für SDS- und SDS-Harnstoffgele gleich durchgeführt. Alle Schritte geschahen bei leichter Bewegung (60 Upm) auf einem Schwenktisch.

3.8.3.1. Coomassie-Färbung

Das Gel wurde sofort nach Beendigung der Elektrophorese in 20 %ige TCA gelegt, wodurch die Proteine im Gel fixiert werden. Nach 30 min wurde das Gel 30 Sekunden lang in Entfärbelösung gewaschen. Die Färbung erfolgte während 30 min in der Färbelösung und die Entfärbung, unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung, in 3-5 Stunden. Das Entfärben konnte durch Erhitzen des Gels im Wasserbad auf ca. 50⁰C beschleunigt werden. Dabei ist ebenfalls ständige Bewegung erforderlich.

Durch diese Methode können Banden, die mindestens 50-100 ng Protein enthalten, identifiziert werden.

- Färbelösung: 0,5 g Coomassie wurden in 250 ml Methanol gelöst und dann 1:1 mit 20 %igem Eisessig gemischt und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung war mehrfach verwendbar.
- Entfärbelösung: 35 % Methanol
10 % Eisessig

3.8.3.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde im wesentlichen nach der Methode von Heuvelshoven und Dernick (1983) durchgeführt. Die besten Ergebnisse konnten mit Coomassie vorgefärbten Gelen erzielt werden.

Das entfärbte Gel wurde zunächst 5 min mit 10 %igem Ethanol und dann drei mal für 3 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde 30 min lang in 0,1 %igem Silbernitrat angefärbt, kurz mit H_2O gewaschen und dann ca. 10 min in der Entwicklerlösung so lange geschüttelt, bis die Proteinbanden stark angefärbt waren. Ein dunkler Hintergrund war dabei nicht störend, da er beim abschwächen verschwand. Die Entwicklung wurde durch Einlegen in 1 %ige Essigsäure gestoppt. Nach dreimaligem Waschen für 3 min in H_2O konnte das Gel mit Farmerschem Abschwächer (Tetenal) vorsichtig entfärbt werden. Um die Proteine stärker anzufärben, konnte die Färbung noch einmal wiederholt werden. Dazu mußte das Gel solange entfärbt werden, bis die Proteinbanden wieder eine blaue Farbe annahmen. Der Abschwächer wurde zunächst unter fließendem Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser solange aus dem Gel gewaschen, bis dieses die gelbe Farbe des Abschwächers völlig verlor. Nun konnte die Färbung ab dem Silbernitrat-Färbeschritt wiederholt werden.

Die relativen Intensitäten der Banden nach der Coomassiefärbung entsprachen denen, die sich nach der zweiten Silberfärbung zeigten. Die erste Silberfärbung führte dagegen oftmals zu einer Veränderung der Intensitäten. Für quantitative Abschätzungen wurden daher entweder Coomassie- oder 2 mal mit Silber gefärbte Gele herangezogen. Mit der Silberfärbung können Banden, die mindestens 10-20 ng Protein enthalten, angefärbt werden.

- Färbelösung: 0,1 %iges Silbernitrat

Entwickler: 3 % Na_2CO_3
0,02 % Formaldehyd

Farmerscher Abschwächer: 5 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
8 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
ad 500 ml mit H_2O

3.9. Immunologische Methoden

3.9.1. Immunisierung

Immunisiert wurde mit NF I Material, das zuvor über DEAE- und Mono Q Chromatographie (3.3.2.) und präparative Gelretention (3.13.3.) gereinigt worden war. Es wurde eine Maus des Inzuchtstammes Balb/ c immunisiert. Für die ersten beiden Immunisierungen wurde das Material unter denaturierenden Bedingungen aus dem Gel eluiert. Die weiteren Immunisierungen erfolgten mit Protein, das über Elektroelution aus dem Gel gewonnen wurde. Das Protein (15 μg) wurde unter Zusatz von $\text{Al}(\text{OH})_3$ und Freundschens Adjuvans intraperitoneal injiziert. Die nächste Immunisierung erfolgte 6 Wochen später und die weiteren 3 Immunisierungen dann in 2 wöchigem Abstand mit jeweils 5-10 μg NF I unter den gleichen Bedingungen wie oben. Jeweils 4-6 Tage nach einer Immunisierung wurde der Maus eine kleine Menge Blut abgenommen und das Serum im Westernblot getestet.

3.9.2. Westernblot

Analog zu 3.8.1. wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine durch Elektroblothing auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) übertragen. Das Elektroblothing wurde bei einer Stromstärke von 0,8 mA/ cm^2 über Nacht im Kühlraum in einer Sartorius Apparatur durchgeführt.

Blotting Puffer: 20 mM Tris
150 mM Glycin
20 % Methanol

Vor der Abnahme der Nitrocellulose-Membran vom Gel wurden die Geltaschen mit Kugelschreiber auf der Membran eingezeichnet und die Gelspuren durchnummeriert. Die Membran wurde auf der Höhe des Farbmärkers mit einem Skalpell abgeschnitten. Sie wurde 2 mal mit H₂O gewaschen und die Proteine dann für 5 min in 0,2 % Pouceau S in 3 %iger TCA angefärbt. Nach erneutem 2 maligem Waschen in H₂O wurden die Markerbanden mit einem Kugelschreiber markiert. Für die immunspezifische Färbung wurden nun den Gelspuren entsprechende Streifen geschnitten. Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung (60 Upm). Um unspezifische Färbereaktionen zu vermeiden, wurde die Membran zunächst 60 min mit BSA in Puffer W1 abgesättigt. Währenddessen konnten Verdünnungsreihen des spezifischen Serums bzw. des Kontrollserums (gewonnen von nicht immunisierten Mäusen des gleichen Stammes Balb/ c) in Puffer W1 erstellt werden. Die Streifen wurden in 4 ml Greiner Röhrchen überführt. Es wurden zu jeweils 4 ml W1 Puffer 20 µl der entsprechenden Serumverdünnung gegeben und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur bewegt. Das Waschen der NC-Membranstreifen erfolgte anschließend zusammen in einer Kulturschale 10 min lang in 40 ml W2 Puffer und 2 mal 20 min lang in W3 Puffer .

Die immunspezifische Anfärbung geschah mit Hilfe enzymgekoppelter Anti-Maus Antikörper. Die Streifen wurden dazu erneut in 4 ml Greiner Röhrchen enthaltend 4 ml W1 Puffer überführt, wozu dann 4 µl alkalische Phosphatase gekoppelte Kaninchen Anti-Maus Antikörper zugesetzt wurden. Nach 60 minütiger Inkubation wurden die Streifen dann wieder zusammen wie oben beschrieben in W2 Puffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 25 ml W4 Puffer unter Zugabe von 12,5 µl NBT (Nitroblue Tetrazolium in 70 % DMF von Sigma) und 75 µl BCIP (5 Bromo 4 Chloro 3 Indolyl Phosphat in 100 % DMF (Boehringer)), über Nacht. Die NC-Streifen wurden nun 2 mal mit H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet.

W1 Puffer: 0,9 % NaCl

10 mM Tris/ HCl, pH 7,4

5 % Rinderserumalbumin (BSA)

W2 Puffer: 0,9 % NaCl

10 mM Tris/ HCl, pH 7,5

W3 Puffer: 0,9 % NaCl

10 mM Tris/ HCl, pH 7,5

0,05 % Triton X 100

W4 Puffer: 100 mM NaCl

100 mM Tris/ HCl, pH 8,8

5 mM MgCl₂

3.10. Enzymatische Reaktionen an DNA

3.10.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Nach enzymatischen Reaktionen an DNA und generell zur Entfernung von Nukleasen ist es notwendig, die entsprechenden Proteine zu denaturieren und die DNA von ihnen zu befreien. Dazu wurde die Probe nacheinander mit einem gleichen Volumen Phenol, mit Phenol/ Chloroform (1/1) und mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24/1) extrahiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 2 min in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, die obere wässrige DNA enthaltende Phase abgenommen, und in ein neues Gefäß überführt.

Die Konzentrierung von DNA erfolgte durch Ethanolfällung. Hierbei wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Volumen -20°C kaltem 95 %igem Ethanol versetzt. Die Fällung geschah dann in 30 min bei -80°C , oder über Nacht bei -20°C . Die DNA wurde durch 20 minütige Zentrifugation (14000 Upm Eppendorffzentrifuge, -20°C) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und in TE Puffer, pH 8,0 aufgenommen. Sollten kurze Oligonukleotide gefällt werden so wurde dem Fällungsansatz zusätzlich 1/10 Volumen 0,1 M MgCl_2 zugegeben. Die Fällung erfolgte dann über Nacht bei -80°C . Abzentrifugiert wurde bei 20000 Upm im SS34 Rotor (Sorvall Zentrifuge, -20°C). Die DNA wurde dann in 100 μl 0,3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 10 mM MgCl_2 aufgenommen und die Fällung unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

3.10.2. Restriktions-Spaltung von DNA

Die DNA wurde dazu in einer Konzentration von 0,1 bis $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt. Die Spaltung wurde unter Einsatz des entsprechenden Volumens 10 x Enzympuffer (für Eco R I Verdau: 1 M Tris/ HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl_2 , 500 mM NaCl, 1 mg/ ml BSA) mit einer Enzymeinheit/ μg DNA durchgeführt. Die Inkubation erfolgte 1-2 Stunden bei 37°C .

3.10.3. Phosphatasebehandlung

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten war es notwendig, das 5'-endständige Phosphat abzuspalten, um es gegen 32 -Phosphat auszutauschen. Die DNA-Lösung wurde dazu mit 1/ 20 Volumen 20 x RAP-Puffer auf die geeignete Salzbedingung eingestellt und die Reaktion mit 1-5 Enzymeinheiten alkalischer Phosphatase (aus Rinderdarm) 30 min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das Protein durch Phenolextraktion entfernt und die DNA gefällt.

20 x RAP-Puffer: 0,8 M Tris/ HCl, pH 8,0
 0,1 M $MgCl_2$
 10 mM $ZnCl_2$

3.10.4. Phosphorylierung von DNA

Die Phosphorylierung mit T4 Polynukleotidkinase wurde mit Oligonukleotid-einzelsträngen und mit DNA-Doppelsträngen, die ein überhängendes 5'-Ende mit freier Hydroxylgruppe vorweisen, durchgeführt.

3.10.4.1. Phosphorylierung der Oligonukleotide für die Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie

Es wurden 400 nmol des doppelsträngigen, in 100 µl H_2O gelösten Oligonukleotids (3.5.) mit 57,5 µl H_2O , 10 µl 0,1 M ATP, pH 7,5, 20 µl 10 x Kinasepuffer und 12,5 µl Polynukleotidkinase (NEN, entsprechend 175 Enzymeinheiten) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Die Oligonukleotide standen nun bereit zur Ligasereaktion.

10 x Kinasepuffer: 0,5 M Tris/ HCl, pH 8,0
 50 mM DTT
 1 mM Spermidin
 1 mM EDTA, pH 8,0
 0,1 M $MgCl_2$

3.10.4.2. Radioaktive Markierung von DNA mit γ - ^{32}P dATP

Die Markierung von DNA mit T4 Polynukleotidkinase erfolgt im Prinzip wie unter 3.10.4.1. beschrieben. Zwischen 1 und 20 pmol Enden (Fragment oder Oligonukleotid) wurden in einem Ansatzvolumen von 20 μl im gleichen Kinasepuffer mit 1-2 μl Kinase und 50-100 μCi γ - ^{32}P -dATP (Amersham, 3000 Ci/ mol) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μl TE-Puffer gestoppt. Zur Abtrennung von nicht eingebautem ATP wurde der Ansatz über einen Anionenaustauscher (DE 52, Whatman) geschickt. Das Säulenmaterial wurde dazu in TE-Puffer vorgequollen und dann in eine 1 ml Spritze (Terumo), deren Öffnung zuvor mit silikonisierter Glaswolle verstopft worden war, gefüllt. Die Säule wurde 3 mal mit je 500 μl TE-Puffer gespült bevor die Probe aufgetragen wurde. Zum Waschen und Eluieren wurde die Spritze jeweils in ein 10 ml Röhrchen überführt und 3 min in der Wifug Tischzentrifuge auf höchster Stufe zentrifugiert. Freies dATP wurde durch fünfmaliges Waschen mit STE 1 abgetrennt. Die markierte DNA eluierte bei dreimaligem Waschen mit je 500 μl STE 2. Die Markierungs- und Reinigungseffizienz konnte durch die TCA Fällung eines Aliquots bestimmt werden.

TE: 10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA

STE 1: 10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA
200 mM NaCl

STE 2: 10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA
500 mM NaCl

pH jeweils 8,0

3.10.5. Ligasereaktion

Die Ligierung von Oligonukleotiden für die Affinitäts-Chromatographiesäule wurde folgendermaßen durchgeführt: Die nach 3.10.4.1. phosphorylierten und gefällten Oligonukleotide wurden in 35 μl H_2O aufgenommen. Es wurden 20 μl 10 x Ligasepuffer, 15 μl T4 DNA-Ligase (15 Enzymeinheiten) und 30 μl 0,1 M ATP, pH 7,5 zugegeben, und der Ansatz vorsichtig aber gründlich vermischt. Die Inkubation erfolgte 24-48 Stunden bei 16°C. Der Fortgang der Reaktion wurde auf einem Agarosegel überprüft. (siehe Fig. 3.3.). Nach 16 Stunden wurden erneut 20 μl 0,1 M ATP und 1 μl T4 DNA Ligase zugesetzt. Der Ansatz wurde dann phenolisiert und Ethanol gefällt, wie unter 3.9.1. beschrieben, und in 100 μl H_2O aufgenommen. Die ligierten Oligonukleotide standen nun bereit zur Kopplung an die Bromcyan-aktivierte Sepharose.

10 x Ligasepuffer: 0,5 M Tris/ HCl, pH 7,4, 100 mM MgCl_2 , 10 mM Spermidin
250 mM DTT

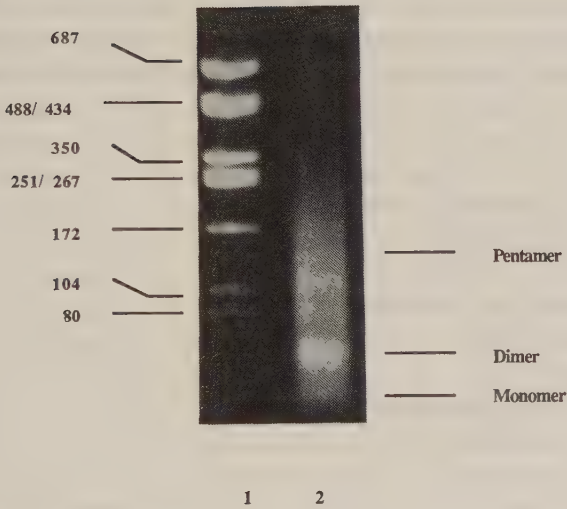
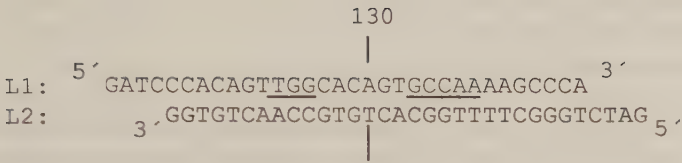


Fig. 3.3. Ligierung von Oligonukleotiden zu Oligomeren. **a.** Sequenz des für die Ligierung verwendeten Oligonukleotids L₁L₂. **b.** 2 %iges Agarosegel. Spur 1: Größenmarker, pUC 12, Hae III verdaut. Die Zahlen geben die Länge der Fragmente in bp an.

3.11. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

3.11.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 1-2 %igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in Tris-Acetat Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht, auf 65°C im Wasserbad abgekühlt und mit 0,5 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt. Zur schnellen Analyse wurden 8 mm hohe, 50 x 75 mm Gele (Babygel, BRL) gegossen. Sonst wurden verschieden große Horizontal-und Vertikalgele verwandt. Nach dem Erstarren des Gels (mindestens 1 Stunde) wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit ca 5 V/ cm in Tris-Acetat Puffer durchgeführt. Die DNA wurde nach Beendigung der Elektrophorese durch Bestrahlen des Gels mit UV Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera (Polaroid Film Typ 107) fotografiert.

Tris-Acetat Puffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 7,8
 5 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA

Auftragspuffer: 10 mM Tris/ HCl, pH 8,0
 50 mM EDTA
 1 % SDS
 0.1 mg/ ml Bromphenolblau
 25 µg/ ml Xylencyanol
 30 % Glycerin

3.11.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

nach Winberg und Hammarskjöld (1980)

Die Agarose Gelelektrophorese erfolgte wie unter 3.10.1. beschrieben. Das Gel wurde mit langwelligem UV Licht (360 nm) bestrahlt. In Laufrichtung hinter der zu isolierenden DNA-Bande wurde mit dem Skalpell ein Schnitt gesetzt und eine DEAE-Cellulose Membran (Schleicher und Schuell, NA-45) in die Schnittstelle eingeführt. Das Gel wurde kurze Zeit erneut der Elektrophorese unterworfen, wobei die DNA auf die Membran läuft und an ihr gebunden bleibt. Die Membran wurde in einem Eppendorfgefäß mit 250 µl NET Hochsalzpuffer bedeckt und zum Ablösen der DNA 1-3 Stunden bei 68° C inkubiert. Nach dem Abpipettieren der DNA-Lösung wurde die

Membran mit 50 µl des gleichen Puffers abgespült. Die DNA-Lösung konnte von Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit 900 µl nButanol (H₂O gesättigt) und Phasentrennung durch Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge befreit werden. Die obere organische Phase wurde verworfen und die DNA nach Zugabe von 2,5 Volumen absolutem Ethanol, wie unter 3.9.1. beschrieben, gefällt.

NET Hochsalzpuffer: 1,0 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris/ HCl, pH 8,0

3.12. Plasmidisolierung

Ein Kolben mit LB Medium wurde mit 1/ 100 Volumen einer Übernachtskultur der das gewünschte Plasmid beinhaltenden Bakterien angeimpft. Dem Medium wurde nach Bedarf 50 mg/ l Ampicillin bzw. 12,5 mg/ l Tetracyclin zugesetzt. Die Bakterien wurden unter Schütteln bei 37⁰ C inkubiert, bis die Suspension eine OD₆₀₀ von 0.8 bis 1 erreicht hatten. Dann wurden 170 mg/ ml Chloramphenicol zugesetzt und über Nacht weitergeschüttelt. Die Bakterien wurden dann vorsichtig abzentrifugiert (9000 Upm, GSA Rotor, Sorvall Zentrifuge, 4⁰ C) und unter den gleichen Bedingungen 1 mal mit 60 ml TE Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in Resuspensionspuffer aufgenommen, auf Eis gestellt und mit 1 ml Lysozymlösung (2 mg/ ml) versetzt. Nach 5 Minuten wurde 1 ml EDTA (0,5 M) und nach weiteren 10 min 10 ml autoklavierter Tritonmix zugegeben. Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln 20 min auf Eis gestellt und das Lysat dann abzentrifugiert (20000 Upm, 30 min, SS 34, Sorvallzentrifuge, 0⁰ C). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und sein Volumen bestimmt. Es wurde darauf geachtet, daß möglichst wenig von der hoch viskosen zellulären DNA mitgeschleppt wurde. Pro ml Überstand wurden 0,95 mg CsCl eingewogen und 40 µg Ethidiumbromidlösung (10 mg/ ml) zugesetzt.. Die Lösung wurde nach Durchmischen und sorgfältigem Lösen des CsCl in einem Sorvall TV865 Rotor zentrifugiert (40000 Upm, 20 Stunden, 18⁰ C). Unter langwelliger UV Bestrahlung (366 nm) wurde aus dem Gradienten die fluoreszierende Plasmidbande durch seitliches Punktieren abgenommen. Das Ethidiumbromid wurde durch viermaliges Ausschütteln mit einem fünffachen Volumen Isoamylalkohol entfernt, die Phasen jeweils durch Zentrifugation getrennt. Das CsCl wurde nach nochmaligem Ausschütteln mit einem fünffachen Volumen CIA (Chloroform/ Isoamylalkohol 24 / 1) durch zweimalige Dialyse (30 min, Raumtemperatur) gegen jeweils 4 l TE Puffer entfernt. Die Plasmidlösung wurde 2 mal mit Phenol und 1 mal mit CIA ausgeschüttelt, die Phasen wiederum durch Zentrifugation getrennt. Die DNA wurde nun wie unter 3.9.1. beschrieben gefällt.

LB Medium: 10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt
 5 g NaCl mit H₂O ad 1 l

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris/ HCl, pH 8,0
 40 mM EDTA
 25 % Sucrose

Tritonmix: 50 mM Tris/ HCl, pH 8,0
 60 mM EDTA
 0,1 % Triton X 100

3.13. Der Gelretentionstest

Diese Methode beruht auf der Beobachtung von Fried und Crothers (1981/84), daß Proteine, die an eine DNA-Probe binden, in nativen Polyacrylamid Gelen als stabiler Komplex elektrophoretisiert werden können. Der Komplex läuft dabei schneller als das freie Protein auf Grund der negativen Ladung, die ihm von der DNA verliehen wird. Die DNA wird dagegen in ihrem Laufverhalten verlangsamt (Retention). Der Test wurde in dieser Arbeit dazu verwandt, NF I nach Säulenchromatographie in den Fraktionen nachzuweisen, die Bindungseigenschaften zu charakterisieren, den NF I Gehalt zu quantifizieren und das Protein zu reinigen.

3.13.1. Analyse von Protein-DNA-Komplexen in nicht-denaturierenden Gelen

Ein Aliquot einer Reinigungsstufe wurde dazu mit 5-20 fmol eines ³²P-markierten Oligonukleotids in Puffer A enthaltend 100 mM NaCl (wenn nicht anders beschrieben) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Sofern Rohextrakten bzw. grob gereinigte Fraktionen getestet wurden, so wurden maximal 10 µg Gesamtprotein eingesetzt und dem Ansatz 0,5 - 1 µg Kompetitor-DNA (poly dIdC) zugegeben. Zugabe des Kompetitors bewirkt ein besseres Eintreten des Protein-DNA-Komplexes in die Gelmatrix. Bei den Kompetitionsversuchen erfolgte die Mischung von ³²P-markierte DNA-Probe mit der unmarkierten DNA vor der Zugabe des Proteins. Nach abgeschlossener Inkubation wurde ein Fünftel Volumen Auftragspuffer zugesetzt und die Probe sofort auf das Gel aufgetragen. Es wurden zumeist 14 x 14 cm² große, 1,5 mm dicke, 11 %ige native Polyacrylamid Gele in 0,375 M Tris Puffer pH 8, 8 verwendet. Für Schnelltests und kleine Probenvolumina wurden 8 x 8 cm² große, 1 mm dicke Gele verwandt (Biometra Gelapparat). Nach

mindestens 2 stündiger Polymerisation wurden die Gele 30 min vorelektrophoretisiert. Nach Auftragen der Probe wurden die großen Gele für 3-4 Stunden mit maximal 100 V und die kleinen Gele für 1-2 Stunden mit maximal 80 V elektrophoretisiert. Das Gel wurde in einer Lösung von 10 % Essigsäure und 40 % Methanol 30 min fixiert und anschließend getrocknet. Exponiert wurde bei -80°C mit Verstärkerfolie (Film: Kodak X-AR 5).

Gellösung: 44 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid 9 ml
 Tris/ HCl pH 8,8 (0,75 M) 18 ml
 1 % APS 0,72 ml
 H₂O ad 36 ml
 Polymerisationsstart, Temed 60 µl

Auftragspuffer: 0,625 M Tris/ HCl pH 6,8
 25 % Glycerin
 0,1 M DTT
 0,05 % Bromphenolblau

Laufpuffer: 0,05 M Tris
 0,384 M Glycin

3.13.2. Quantifizierung von NF I

Aliquots der zu quantifizierenden Proteinlösung wurden mit steigenden Mengen von ^{32}P -markiertem spezifischem Oligonukleotid inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurde eine bestimmte Menge des Oligonukleotids ohne Protein mit Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde, wie unter 3.13.1. beschrieben, durchgeführt. Nach dem Exponieren des Gels wurden die DNA und die Komplexbanden mit Hilfe der Autoradiographie lokalisiert und ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in 20 ml Szintillationsgefäße überführt, 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugesetzt und die radioaktive Strahlung im Szintillationszähler gemessen. Aus dem Wert, der sich für den reinen Oligonukleotidansatz ergab, konnte die spezifische Aktivität bestimmt werden. Dieser Wert entsprach dem, der über die TCA-Fällung erhalten worden war. Der NF I Gehalt wurde über die Aktivität des Komplexsignals im Bereich, in dem kein Anstieg des Signals durch Steigerung der DNA-Menge festzustellen war, berechnet. War die Konzentration zu hoch, um diesen Sättigungsbereich zu erreichen, so mußte der Versuch mit einer geeigneten Verdünnung wiederholt werden. Es wurde eine 1/1 Stöchiometrie angenommen.

3.13.3. Präparative Gelretention

Diese zu einem Reinigungsverfahren umgewandelte Form der Gelretention beruht darauf, daß nicht an DNA gebundene Proteine nicht oder nur langsam während der Elektrophorese in das Gel wandern. Durch die Komplexierung eines Proteins mit DNA aber wird die Wanderungsgeschwindigkeit dieses Proteins erhöht.

Die präparative Gelretention wurde im Prinzip wie unter 3.13.1. beschrieben durchgeführt. Es wurden jedoch dickere Flachgele (3 mm dick) oder Rundgele verwandt (1,3 cm Innendurchmesser, 20 cm lang). Pro Gel wurden maximal 40 pmol NFI mit einem 40-fachen molaren Überschuss des spezifischen Oligonukleotids, 1 pmol 32 P markierten Oligonukleotids und 150 µg poly dIdC inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte entweder in 5 Stunden mit 100 V oder über Nacht mit 20-30 V bei Flachgelen bzw. über Nacht mit 50 V bei Rundgelen. Die Exposition erfolgte über Nacht bei 40°C. Über die Autoradiographie wurde die Position des Protein-DNA-Komplexes ermittelt und das entsprechende Gelstück mit dem Skalpell ausgeschnitten.

3.14. Gewinnung von denaturiertem und nativem Protein nach der präparativen Gelretention

Unter denaturierenden Bedingungen, d.h. unter Anwesenheit eines Detergenz ist die Diffusion von Proteinen aus Gelen erleichtert. Auf diesem Wege konnte NF I zur Sequenzanalyse und Immunisierung gewonnen werden. Bei der Elution von nativem Protein mußte weitgehend auf Detergenz verzichtet werden. Da NF I unter diesen Bedingungen als Komplex mit dem Oligonukleotid eluiert, mußte eine Methode entwickelt werden, durch die der Komplex zunächst dissoziiert und dann das Protein von der DNA abgetrennt werden kann.

3.14.1 Gewinnung von denaturiertem Protein

Das aus der präparativen Gelretention gewonnene Gelstück (3.13.3.) wurde zunächst durch eine 5 ml Spritze gedrückt, wodurch es fein zerkleinert wurde. Die Elution erfolgte durch

Diffusion in einem 10-fachen Volumen des Puffers E (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 % SDS ultrapure) 24 Stunden bei 40°C unter leichter Bewegung. Die Suspension wurde dann durch eine 0,2 µm Membran (Membran und Apparatur von Sartorius SM16307) filtriert und das Filtrat im Amicon Diaflo Konzentrador eingengt und mit 5 Volumina H₂O gewaschen. Sollte das Protein auf weniger als 500 µl konzentriert werden, so geschah dies in einem Rotationsverdampfer (Speed Vac Concentrator).

3.14.2. Gewinnung von nativem Protein.

Das Gelstück wurde wie unter 3.14.1. zerkleinert, jedoch anschließend in Puffer F (25 mM Hepes/KOH pH 7,5, 100 mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,01 % NP 40, 10 mg/ml BSA, 10 % Glycerin) bei 40°C in 44 Stunden unter leichter Bewegung eluiert. Die Suspension wurde filtriert (s.o.) und das Filtrat auf eine mit Puffer F äquilibrierte DEAE Säule (1ml Säulenvolumen) aufgetragen. Auf der Säule blieb der Komplex stabil haften. Nach mehrfachem Waschen wurde das Protein mit einem Stufengradient von 7,5 % gesättigtem Ammoniumsulfat in Puffer F eluiert. Das Eluat wurde sofort gegen Puffer G (25 mM HEPES/KOH pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,01 % NP 40, 50 % Glycerin) für 24 Stunden dialysiert und dann bei -80°C eingefroren.

3.15. DNase I Footprint

Neben den Kompetitionsversuchen (3.11.1.) kann auch durch die "Footprint" Methode eine sequenzspezifische Bindung eines Proteins an eine entsprechende DNA-Probe nachgewiesen werden. Beim partiellen DNase I Abbau, der, mit dem Protein komplexierten DNA bleibt der Bereich, der vom Protein abgedeckt ist, geschützt. Im Vergleich mit einem Kontrollverdau, der in Abwesenheit von Protein durchgeführt wird, kann der durch Protein geschützte Bereich auf einem Sequenzgel sichtbar gemacht werden (Galas und Schmitz, 1978).

Als DNA-Probe wurde ein 156 bp langes Fragment aus dem Plasmid PCMS (Gröger, 1985) verwandt, das die ersten 70 bp der Adenovirus ITR (Ad 5) enthält. Die ³²P-Markierung erfolgte nach der Linearisierung des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease Eco RI. Das Fragment wurde dann mit dem Restriktionsenzym Hind III herausgeschnitten und über ein Agarosegel isoliert (der Restriktionsverdau wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt).

Ein Reaktionsansatz enthielt jeweils 5 fmol des markierten Fragments und verschiedene NF I Konzentrationen, in Anwesenheit oder Abwesenheit von 100 ng poly dIdC in einem Endvolumen von 22 µl in Puffer A enthaltend 100 mM NaCl. Die Bindereaktion erfolgte in 15 min bei 4°C. Danach wurden 100 µl einer 5 mM CaCl₂ und 10 mM MgCl₂ enthaltenden Lösung zugesetzt. Der Ansatz wurde 2 min in einem 20°C Wasserbad temperiert. Es wurden 12 ng DNase I zugesetzt, gemischt und die Reaktion nach 2 min durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (20 mM EDTA, 25 ng/µl tRNA, 0,1 % w/v SDS) und nach gleichzeitigem Erhitzen auf 80°C für 5 min abgestoppt. Die Probe wurde einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert und die DNA dann gefällt. Parallel wurde der Ansatz ohne Protein genauso behandelt. Die Probe wurde in Formamid Auftragsmix gelöst (98 % entionisiertes Formamid, 10 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau und Xylencyanol), 3 min im Wasserbad gekocht und dann sofort auf Eis gestellt. Es wurde jeweils nur die Hälfte der Probe aufgetragen, der Rest wurde bei -80°C aufgehoben.

Gelelektrophorese: Vor dem Gießen des Sequenzgels wurde die Thermostatisierplatte 2 mal mit Repellentsilan und die Haftplatte 2 mal mit Bindsilan behandelt. Für ein 9 %iges, 60 cm langes und 0,2 mm dickes Gel wurden 28,8 g Harnstoff, 5,13 g Acrylamid und 0,27 g Methylenbisacrylamid abgewogen. Es wurden 6 ml 10 x TEB Puffer zugesetzt, auf 60 ml mit H₂O aufgefüllt und der Harnstoff unter gelegentlichem Umschwenken im 60°C Wasserbad gelöst. Die Lösung wurde dann durch einen 0,45 µm Filter gepreßt. Es wurden 250 µl einer frischen APS Lösung und 22,5 µl Temed zugesetzt und das Gel wurde sofort gegossen. Nach dem Auspolymerisieren (mehrere Stunden oder über Nacht) wurde das Gel auf 65°C temperiert und 30 min vorelektrophoretisiert (2010 Macrophor Electrophoresis unit, LKB; 2297 Macrodrive power supply, LKB). Die Probenaschen wurden dann gründlich ausgewaschen, die Proben aufgetragen und die Elektrophorese in 1 mal TEB in ca. 2 Stunden bei 2400 Volt durchgeführt. Die Thermostatisierplatte wurde vorsichtig abgenommen und das Gel zur Entfernung des Harnstoffs in 10 %iger Essigsäure 15 min lang gebadet. Es wurde dann kurz mit H₂O abgespült und 1-2 Stunden im Wärmeschränk bei 80°C getrocknet. Der Röntgenfilm wurde direkt auf das Gel gelegt und mit einer Andruckplatte beschwert. Die Exposition erfolgte 3-6 Tage bei Raumtemperatur.

10 x TEB Puffer: 1 M Tris, 830 mM Borsäure, 10 mM EDTA.

3.16. Erzeugung von Proteinfragmenten

Gängige Methoden zur Erzeugung spezifischer Spaltprodukte von Proteinen sind der Verdau mit sequenzspezifisch schneidenden Proteasen sowie die chemische Spaltung mit Bromcyan.

3.16.1. Trypsin Verdau

Diese Protease aus Rinderpankreas spaltet spezifisch am Carboxyende von Arginin und Lysin. Die Proteinprobe wurde eingedampft und dann in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat in einer Konzentration von 20-50 ng/μl gelöst. Es wurde 1/40 des Probengewichts Trypsin zugegeben. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 18 Stunden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ameisensäure gestoppt.

3.16.2. V 8 Verdau

Die V8 Protease aus *Staphylococcus aureus* spaltet am Carboxyende von Glutaminsäure. Zur Spaltreaktion wurde das Protein zunächst lyophilisiert, dann in einer Konzentration von 50 ng/μl in 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 7,8 gelöst mit einem Hundertstel des Probengewichts V 8 Protease inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 24 Stunden bei 37°C.

Verdau unter denaturierenden Bedingungen: Es wurden 80 pmol des Proteins in 200 ml H₂O gelöst, 30 μl 3 M TCA zugesetzt, geschüttelt und das Protein dann während 10 min in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde, ohne es zu resuspendieren, mit 0,5 ml -20°C kaltem 80 %igem Ethanol gewaschen und erneut 10 min lang zentrifugiert. Das Protein wurde in 40 ml des Ammoniumcarbonatpuffers gelöst und anschließend einlyophilisiert. Das Pellet wurde nun in 10 ml V 8 10 x Puffer (6 M Harnstoff, 0,5 M Ammoniumhydrogencarbonat) gelöst, 10 min auf 40°C gebracht und der Puffer mit H₂O auf die 1 mal Konzentration gebracht. Es wurden anschließend 0,5 mg Protease zugesetzt und der Ansatz 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

3.16.3. Bromcyanspaltung

Die Bromcyanspaltung bietet im Gegensatz zur proteolytischen Spaltung den Vorteil, daß die Probe nicht mit Protease oder Proteasefragmenten verunreinigt wird. Wird im sauren Milieu gearbeitet, so findet die Spaltung am Carboxyende von Methionin statt. Die Spaltung

wurde unter dem Abzug durchgeführt. Die Probe wurde einlyophilisiert und wie auch das Bromcyan in 70 %iger Ameisensäure gelöst. Es wurden gleiche Volumina von Probe und Bromcyanlösung miteinander gemischt; die Endkonzentration des Bromcyan betrug 0,5 mg/ml. Die Inkubation erfolgte 60 min lang unter Stickstoffbegasung im Dunkeln. Es wurde dann 1 ml H₂O zugegeben und die Probe anschließend einlyophilisiert. Es wurde nochmals 1 ml H₂O zugegeben und wieder lyophilisiert.

3.17. Auftrennung von Peptiden

Mit Trypsin oder V 8 Protease verdaute Proben wurden z.T. auf eine Gelfiltrationssäule (TSK G2000 SW, 7,5 x 600 mm, LKB) aufgetragen. Die Probe wurde dazu in 50 %iger Ameisensäure gelöst. Der Lauf wurde in 0,05 %iger TFA durchgeführt, bei einer Laufgeschwindigkeit von 10 ml/ Stunde. Über das Chromatogramm konnte nachgewiesen werden ob eine Spaltung stattgefunden hat und wenn ja, konnte die Auftrennung von Peptidfamilien ähnlicher Größe gezeigt werden.

Einzelpeptide konnten über "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) aufgetrennt werden. Es wurden eine LKB Apparatur und unterschiedliche "reverse phase" Säulen dazu benutzt. Im Gegensatz zu den stark polaren geladenen Anionenaustauschersäulen ist die Säulenmatrix der "reverse phase" Säule weitgehend unpolar, während der Laufpuffer polar ist. Für die Peptidtrennung haben sich Silica Säulen als besonders geeignet erwiesen, die über Siliolgruppen mit C8 bis C18 Alkylresten verknüpft wurden. Je länger die Kettenlänge ist, desto stärker wird ein Peptid retardiert. Als Puffersystem werden polare Startpuffer und lineare Gradienten eines organischen Lösungsmittels verwendet. Hier wurde 0,1 %ige TFA und Acetonitril verwendet. Das TFA Puffersystem hat dabei folgende Vorteile: 1. Die Löslichkeit großer Peptide ist in diesem Puffer besser als in H₂O. Es können Verluste während der Chromatographie klein gehalten werden. 2. Durch den niedrigen pH von 2,2 befinden sich die Carboxylgruppen von Glutaminsäure und Asparaginsäure in undissoziierter Form, was die Haftung der Probe an dem Säulenmaterial verbessert. 3. Der Einfluß freier Silanolgruppen auf die Trennung ist reduziert. 4. Dieser Puffer ist flüchtig und 5. wie auch Acetonitril transparent bei 206 nm, der Wellenlänge bei der die Peptidbindungen absorbieren.

Um die Elution zu beschleunigen wurde ein Acetonitrilgradient von 0-60 % Acetonitril in 10,1 M TFA angelegt. Zusätzlich zur Absorptionsmessung bei 206 nm wurde die Absorption bei 280 nm festgestellt. Durch den Vergleich der Spektrogramme können Rückschlüsse auf die Reinheit eines Peaks gemacht werden. Genaue Laufparameter sind in den Legenden im Ergebnisteil verzeichnet.

3.18. South Western Verfahren zur Durchmusterung von Expressions-cDNA-Banken

Bei diesem Verfahren werden λ gt11 Expressions -Genbanken auf einem *lon* *Protease* defizienten, und temperaturabhängig Lysis defekten Stamm ausplattiert. Nach dem Beginn der Lysis wird die Expression von β Galaktosidase-Fusionsproteinen durch Zugabe von IPTG induziert. Nach mehrstündiger Inkubation werden Nitrocellulosefilterabzüge gemacht und diese dann auf DNA-bindende Proteine exprimierende Klone hin getestet. Die Methode wurde in Anlehnung an die Screening Methode von Expressionsbanken mit Antikörpern, entwickelt von Young und Davis (1983), durchgeführt.

Es wurde eine Übermalkultur des Bakterienstamms *E. coli* 1090 (Δ lac U 169 pro A+ *lon* ara D 139 str A sup F) in LB mit Ampicillin gezogen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und anschließend in einem fünftel Volumen SM Medium aufgenommen. Für Phagenplaques auf großen Platten mit einem Durchmesser von 150 mm wurden 600 μ l Bakterien mit 2×10^7 Phagen infiziert, für kleine Platten wurden 200 μ l Bakterien verwendet. Nach zwanzig minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Bakteriensuspension mit 3 ml Top Agarose vermischt und sofort ausplattiert. Die Platten wurden 3 Stunden bei 42°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Nitrocellulosefilter 30 Minuten lang in 10 mM IPTG getränkt und anschließend 30 Minuten auf Filterpapier getrocknet. Die Filter wurden vorsichtig auf die Platten gelegt und die Platten nun weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Filter wurde dann abgenommen (1. Abzug) und gegen einen zweiten genauso behandelten Filter ausgetauscht. Nach weiteren 3 Stunden wurde auch der 2. Filter abgezogen. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt und die Filter kurz mit TBS enthaltend 0,01 % NP 40 gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte, in Folie verpackt, über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden 15 pmol Oligonukleotid A₁B₁ mit α^{32} P dATP und Klenow Polymerase markiert und über DEAE Chromatographie gereinigt. Die Filter wurden 90 Minuten lang in TBS enthaltend 20 % foetales Kälberserum (FKS) zur Absättigung unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 60 Minuten lang in Puffer A äquilibriert. Die Bindereaktion geschah unter Zugabe von 7,5 pmol Oligonukleotid in Puffer A enthaltend 20 % FKS und 75 mg Hefe tRNA in einem Endvolumen von 30 ml, 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Nicht gebundene DNA wurde durch jeweils halbstündiges Waschen zunächst in Puffer A, dann in TBS mit 20 % FKS und zwei mal in TBS enthaltend 0,01 % NP 40 entfernt. Die Filter wurden entfernt und 3-5 Tage exponiert.

SM-Medium: 5,8 g NaCl
 pro Liter 2 g MgSO₄ x 7H₂O
 50 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5
 5 ml 2 % Gelatine

3.19. Präparation von Bakterienlysaten

Eine frische Übernachtskultur des *E. coli* Stamms 1090 wurde wie oben beschrieben gezogen, abzentrifugiert und in SM Medium aufgenommen. Dann wurden 3 ml der Bakteriensuspension mit 10^7 Phagen infiziert (20 min bei 37°C im Bakterienschüttler). Die Suspension wurde nun zu 50 ml NZCYM Medium gegeben. Die Kultur wurde bei 42°C geschüttelt und der Anstieg der optischen Dichte durch Messung der Absorption bei 600 nm verfolgt. Bei einer OD von ca. 1 wurde dann die Transkription des lac Z Gens und damit auch die Bildung von vorhandenen Fusionsproteinen durch Zugabe von IPTG induziert. Die Kultur wurde gleichzeitig in einen 37°C warmen Schüttler überführt. Nach 15 Minuten wurde die Bakterienkultur auf 0°C heruntergekühlt und 1mM Aminoacetonitril-Hydrogensulfat als Proteaseinhibitor zugesetzt. Anschließend wurden alle Partikel durch Filtration durch einen Sterilfilter ($0,45\text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser) entfernt. DNA-bindende Proteine wurden über Affinitätschromatographie angereichert.

NZCYM Medium: 10 g NZ Amin
 5 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 1 g Casamino-säuren
 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \times \text{H}_2\text{O}$

3.20. Reinigung von DNA-bindenden Proteinen aus Bakterienlysaten.

Für den Chromatographieschritt wurde das gleiche Säulenmaterial wie für die NF I Reinigung (vergl. Fig. 3.3 und Abschnitt 4.2.7.) verwandt. Um etwaige Verunreinigungen

mit Fremdprotein zu verhindern, wurde jeweils frisches Säulenmaterial benutzt. Das Säulenvolumen betrug 1 ml, der Lauf wurde durch Anschließen an die FPLC Anlage automatisiert. Als Laufpuffer diente Puffer E. Zusätzlich zum Proteaseinhibitor wurden vor dem Auftragen von 30 ml Lysat dieses noch auf 15 mM EDTA eingestellt, damit im Lysat enthaltene DNasen nicht die an Sepharose gekoppelte DNA abbauen. Es wurden ferner 500 µg poly dIdC zugesetzt, um die Retention von unspezifisch an DNA-bindenden Proteinen gering zu halten. Die Chromatographie wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,3 ml/ min durchgeführt. Nach dem Auftragen der Probe wurde solange mit Puffer E nachgewaschen, bis die OD des Durchlaufs wieder ihren Ausgangswert erreicht hatte (10-15 ml). Es wurde dann ein Stufengradient von jeweils 2 ml von 0,7 M-, 1,3M- und 2,5 M KCl in Puffer E angelegt. Die Eluate wurden sofort gegen Puffer E mit 50 % Glycerin mindestens 24 Stunden lang dialysiert. Aliquots wurden sofort getestet oder bei - 20⁰ C eingefroren.

Puffer E: 25 mM HEPES/ KOH, pH 7,5
 100 mM KCl
 1mM DTT
 0,01 % NP 40
 20 % Glycerin
 10 mM EDTA
 1mM Aminoacetonitril-Hydrogensulfat

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Gebiete:

1. Charakterisierung der Wechselwirkung von NF I mit DNA beobachtet im Rohextrakt.
2. Reinigung von NF I.- Analyse der Protein-DNA-Interaktion mit hochgereinigtem NF I.
3. Peptiderzeugung, Auftrennung und Sequenzierungsergebnisse.
4. Ansatz zur Klonierung.

Statt aus HeLa Zellen, der ursprünglichen Quelle für NF I (Nagata et al., 1982) wurde das Protein hier aus Schweineleber gewonnen. So konnte auf die arbeitsaufwändige und teure Zellkultur verzichtet werden, um dieses in geringen Konzentrationen auftretende Kernprotein zu isolieren.

4.1. Charakterisierung der DNA-Bindung von NF I im Rohextrakt.

Es wurde zunächst untersucht, bei welchem pH und Salzgehalt die Komplexbildung von Protein und DNA besonders stark ist. Unter den experimentell bestimmten Bedingungen wurde dann durch Wettbewerbsversuche die Bindungsspezifität des Proteins getestet. Des weiteren wurde versucht, den Komplex durch ein in DNA interkalierendes Agens zu dissoziieren.

Als DNA-Probe wurde das aus der Adenovirus Typ 2 bzw 5 ITR abgeleitete, die NF I Bindestelle tragende, synthetisch hergestellte Oligonukleotid A₁B₁, verwandt.

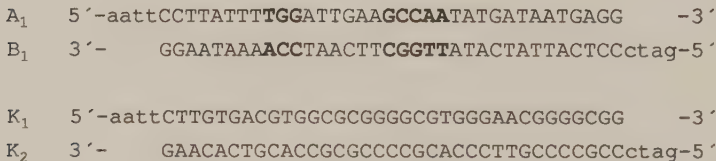


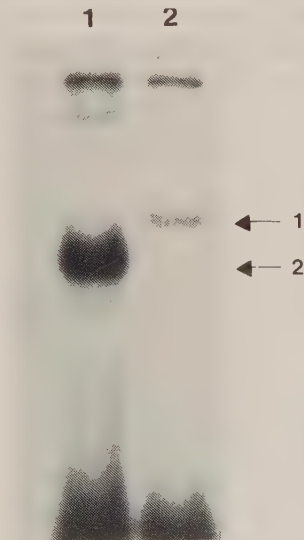
Fig.4.1. Sequenz der für die Gelretention eingesetzten Oligonukleotide. Der Oligonukleotid Doppelstrang A₁B₁ trägt die NF I Bindestelle aus der Adenovirus Typ 2/5 ITR (Position 17 bis 51, siehe auch Fig.1.1.). Die Sequenz des Oligonukleotids K₁K₂ stammt aus demselben Virustyp und reicht dort von Position 60 bis 94. Die mit kleinen Buchstaben geschriebenen überhängenden DNA-Enden ergeben, nach Ligation der Oligonukleotide, potentielle Restriktionsenzym-Erkennungsstellen. Fett gedruckt ist die NF I Konsensussequenz.

4.1.1. Der Gelretentionstest.

Zum Nachweis von Protein-DNA-Komplexen und zur Proteinreinigung (siehe 4.2.7.) wurde der Gelretentionsassay für NF I ausgearbeitet. Der Test beruht auf der Beobachtung von Fried und Crothers (1981; 1984), daß Protein-DNA-Komplexe während der Elektrophorese in nativen Polyacrylamidgelen stabil bleiben. Der Komplex zeigt dabei eine veränderte Mobilität gegenüber freiem Protein und DNA. Durch die radioaktive Markierung der DNA kann die Komplexbande nach Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Figur 4.2. zeigt ein Retentionsgel. Kernextrakt wurde mit dem Oligonukleotid A₁B₁ (Fig.4.1.), das die NF I Bindestelle trägt (Spur 1) und mit dem Kontrolloligonukleotid K₁K₂ inkubiert. In Spur 1 erscheint die NF I spezifische Bande 2, die in Spur 2 nicht auftaucht. Die DNA in der Komplexbande ist gegenüber der freien DNA, die schon das Gelende erreicht hat, retardiert. In Spur 2 erscheint dagegen eine höher laufende Bande, die ihrerseits für das Oligonukleotid K₁K₂ spezifisch ist.

Fig.4.2. Gelretentionstest. Es wurden 10 µl Kernextrakt (entsprechend ca. 70 fmol NF I) mit 10 fmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid A₁B₁ (Spur 1) bzw K₁K₂ (Spur 2) 15 min bei Raumtemperatur in einem Endvolumen von 20 µl inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf einem 11% igen nativen Polyacrylamid aufgetrennt und die Banden dann durch Autoradiographie sichtbar gemacht.



Zu den Vorteilen dieser Methode gehören ihre hohe Sensitivität (die Nachweisgrenze für Protein-DNA-Komplexe liegt im femto- bis attomolaren Bereich) ihre gute Reproduzierbarkeit und die im Verhältnis zur Footprint-Technik einfache Durchführung. Ferner können im Gegensatz zum vielfach verwandten Filterbindungstest gezielt Protein-DNA-Interaktionen in Rohextrakten ohne Störung durch Überlagerung von unspezifischen Protein-DNA-Wechselwirkungen beobachtet werden.

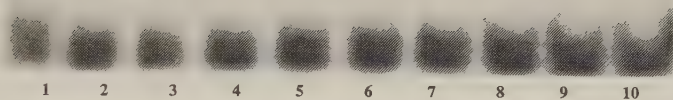
4.1.2. Salzabhängigkeit der Bindung

Es wurden Aliquots des Rohextraktes mit dem NF I spezifischen ^{32}P -markierten Oligonukleotid und Kompetitor-DNA im Standardpuffer A bei unterschiedlichen NaCl Konzentrationen inkubiert. Der Bereich von 20 mM bis 450 mM NaCl wurde bei diesem Versuch abgedeckt. Das stärkste Komplexsignal wurde bei 100-150 mM NaCl erzielt. Geringere Konzentrationen führen zu sehr viel schwächerer Bindung, während bei Steigerung über 200 mM NaCl die Komplexsignale nur langsam schwächer werden (Fig.4.3.a.).

4.1.3. pH Abhängigkeit der Bindung.

Es wurde im Bereich von pH 6,0 bis pH 8,5 die Komplexbildung untersucht. Dafür wurden drei verschiedene Puffersysteme benötigt. Für pH 6,0 und pH 6,5 wurde 25 mM Bis Tris, für pH 7,0 und 7,5 25 mM HEPES und für pH 8,0 und 8,5 wurde 25 mM Tris Puffer verwandt. Alle Puffer enthielten 1mM DTT, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl und 10% Glycerin. Der Gelretentionstest wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Komplexbildung im betrachteten pH Bereich blieb unverändert (Fig.4.3.b.) .

a.



b.

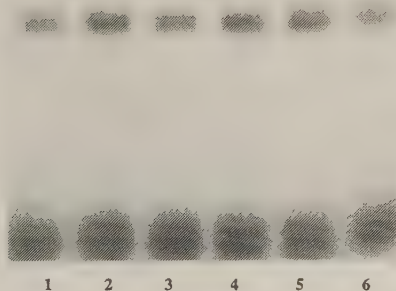


Fig 4.3. Salz- und pH- Abhängigkeit der DNA-Bindung von NF I. Es wurden 16 fmol ^{32}P -markiertes Oligonukleotid A_1B_1 mit $1\mu\text{g}$ poly dIdC als Kompetitor DNA pro Ansatz vermischt. **a.** Es wurde in einem Endvolumen von $25\mu\text{l}$ ein Salzgehalt von: Spur 1, 20mM; 2, 50 mM; 3, 100 mM; 4, 150 mM; 5, 200 mM; 6, 250 mM; 7, 300 mM; 8, 350 mM; 9, 400 mM; 10, 450 mM NaCl eingestellt und $2\mu\text{l}$ Rohextrakt dann hinzugefügt. **b.** Es wurden $19\mu\text{l}$ des jeweiligen Puffers und $2\mu\text{l}$ des gegen den jeweiligen Puffer dialysierten Rohextrakts zugesetzt: Spur 1, pH 6,0; 2, pH 6,5; 3, pH 7,0; 4, pH 7,5; 5, pH 8,0; 6, pH 8,5.

4.1.4. Spezifität der Bindung

Die DNA-Bindungsspezifität von NF I wurde durch Kompetitionsversuche nachgewiesen. Hierzu wurde das radioaktiv markierte, NF I-spezifische Oligonukleotid vor der Zugabe des Kernextrakts mit steigenden Mengen an unmarkiertem homologen oder heterologen Oligonukleotid gemischt. In Abbildung 4.4. wurde als heterologes DNA-Fragment ein Oligonukleotid benutzt, das dem Bereich von Position 60 bis 94 des Adenovirus Typ 2/5 entspricht (Fig.4.1.). Die Ansätze enthielten die acht-fache Menge NF I gegenüber markiertem Oligonukleotid. Kompetitiert wurde mit zehn- bis tausend-fachen Überschüssen von unmarkierter gegenüber markierter DNA. Figur 4.4. zeigt, daß durch Zugabe des homologen Oligonukleotids die NF I Bande verschwindet, während sogar ein tausend-facher Überschuß des Kontrolloligonukleotids keinen Einfluß auf das Bandenmuster zeigt. Analoge Versuche mit einer Vielzahl verschiedener DNA-Fragmente und im besonderen mit Oligonukleotiden, die eine mutierte NF I Erkennungsstelle aufwiesen konnten die Spezifität von NF I näher analysieren (Schneider et al., 1986; Meisterernst et al., 1988).

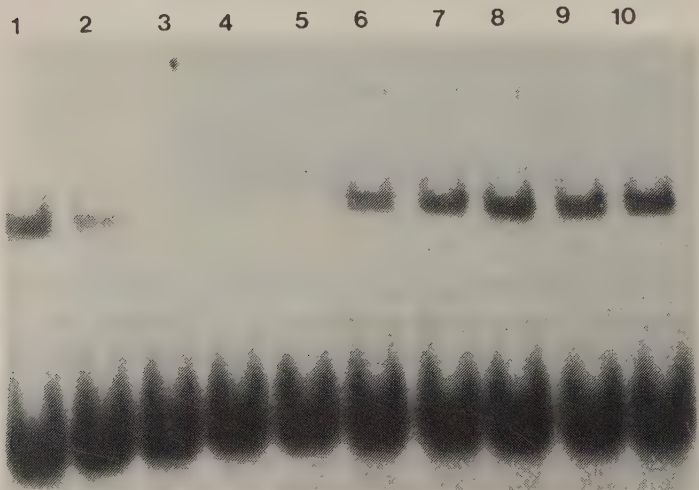


Fig.4.4. Kompetitions-gel. Pro Testansatz wurden 10 µl Rohextrakt und 6 fmol ^{32}P -markiertes Oligonukleotid A_1B_1 eingesetzt. Die markierte DNA wurde vor der Zugabe des Extrakts mit 60, 600, 3000 und 6000 fmol unmarkiertem homologen (Spur 2- 5) bzw heterologen (Spur 7- 10) Oligonukleotid vermischt. In Spur 1 und 6 ist keine unmarkierte DNA enthalten.

4.1.5. Test auf Einzelstrangbindung

Es wurden gleiche Mengen von Rohextrakt mit dem NF I spezifischen Oligonukleotid A_1B_1 bzw. mit den Oligonukleotid Einzelsträngen A_1 und B_1 inkubiert. Das doppelsträngige Fragment wurde hier mit Klenow Polymerase und $\alpha^{32}P$ dATP-markiert, um zu gewährleisten, daß alle Komplexbanden auf der Autoradiographie von Doppelstrangbindung herrühren (Fig.4.5.). Die Bande 1 erscheint sowohl mit doppelsträngiger als auch mit einzelsträngiger DNA, während Bande 2 nur mit dem Doppelstrang erscheint. Die Bande 3 ist das Signal des NF I-DNA-Komplexes. Mit einzelsträngiger DNA erscheint auf gleicher Höhe ein ganz schwaches Signal, welches nicht durch die Interaktion mit NF I herrühren kann, da mit hochreinem NF I (Spur 3 und 4) ein solches Signal nicht auftritt. Die Bande 4 entspricht vermutlich einem Abbauprodukt von NF I, das unspezifisch auch an andere DNA-Fragmente (hier nicht gezeigt) bindet. Was hier für den Strang B_1 gezeigt wurde entspricht dem Ergebnis, welches für A_1 erhalten wurde. NF I bindet somit nicht an einzelsträngige DNA.

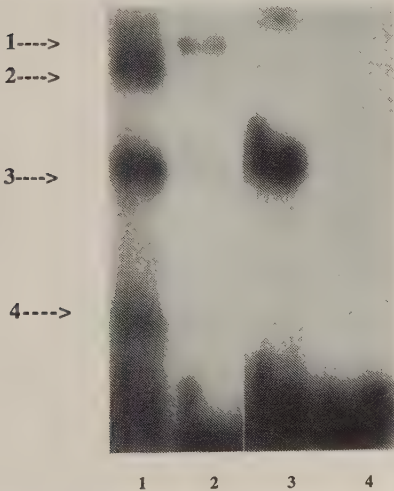


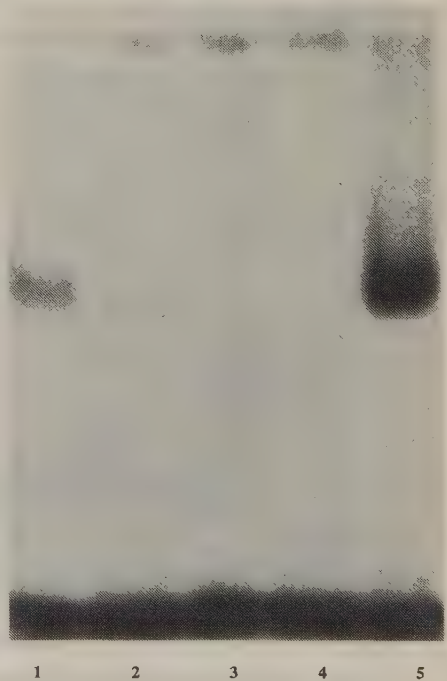
Fig.4.5. Einzelstrangbindung. In Spur 1 und 2 wurden 5 μ l Rohextrakt mit 10 fmol A_1B_1 (Spur 1) und 10 fmol B_1 (Spur 2) in einem Endvolumen von 20 μ l in Puffer A inkubiert. In Spur 3 und 4 wurden entsprechende Ansätze mit hochgereinigtem NF I durchgeführt.

4.1.6. Dissoziierbarkeit der Bindung

Es wurde versucht, die DNA-Interaktion von NF I durch Zusatz des interkallierenden Agens Ethidiumbromid zu dissoziieren. Nach abgeschlossener Komplexbildung wurde Ethidiumbromid in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und der Ansatz weitere 15 min inkubiert. Fig.4.6. zeigt die anschließend durchgeführte Gelretention. In Anwesenheit von 150 nM Ethidiumbromid nimmt die Signalintensität (im Vergleich zur Kontrollspur 5) auf ca. ein Zehntel des Ausgangswertes ab.

Der NF I-DNA-Komplex kann ferner durch Zusatz von Ammoniumsulfat aufgelöst werden (siehe 4.2.7.b.).

Fig.4.6.Dissoziierbarkeit des NF I- DNA-Komplexes. Es wurden 5 µl Rohextrakt mit 10 fmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid A₁B₁ 15 min bei Raumtemperatur in einem Volumen von 20 µl in Puffer A inkubiert. Anschließend wurden in den Ansätzen unterschiedliche Konzentrationen von Ethidiumbromid in einem Endvolumen von 40 µl eingestellt und die Ansätze weitere 15 min lang inkubiert. Spur 1, 50 nM; 2, 150 nM; 3, 300 nM; 4, 700 nM; 5, 0 mM Ethidiumbromid.



4.2. Reinigung von NF I

Ausgehend von einer frischen Schweineleber besteht der erste Reinigungsschritt aus der Isolation von Zellkernen. Dies geschieht nach dem Zellaufschluß durch Zentrifugation durch ein Sucrosekissen und durch hochmolare (2,4M) Sucrose. Organellen und Cytoplasma können so effizient entfernt werden. Die reinen Leberkerne (Fig.3.1.) können anschließend extrahiert werden. Dieser Schritt wurde sehr vorsichtig mit wenig Salz (200 mM NaCl) und in Gegenwart von CaCl_2 zur Stabilisierung der Kerne durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird ein Großteil des NF I extrahiert, während viele andere an DNA gebundene Proteine, z.B. Histone und HMG-Proteine, sowie DNA in den Kernen verbleiben und mit diesen nach abgeschlossener Extraktion abzentrifugiert werden können. Die selektive Extraktion kann somit als weiterer Reinigungsschritt angesehen werden. Da allerdings NF I bei der Affinitätschromatographie erst bei Konzentrationen von 2,5 M KCl von der DNA ablösbar ist (siehe 4.8.), entspricht die extrahierte NF I Menge vermutlich nicht oder unspezifisch an DNA gebundenem Protein. Die, an die Erkennungssequenzen im Genom gebundenen NF I-Moleküle, gehen somit verloren.

Die weitere Aufreinigung von NF I erfolgte über herkömmliche Säulenchromatographie, an die sich wahlweise präparative Gelretention (4.2.7.) oder NF I-spezifische Affinitätschromatographie (4.2.8.) anschlossen. Einen Überblick über die Reinigungsschritte bietet Figur 4.7..

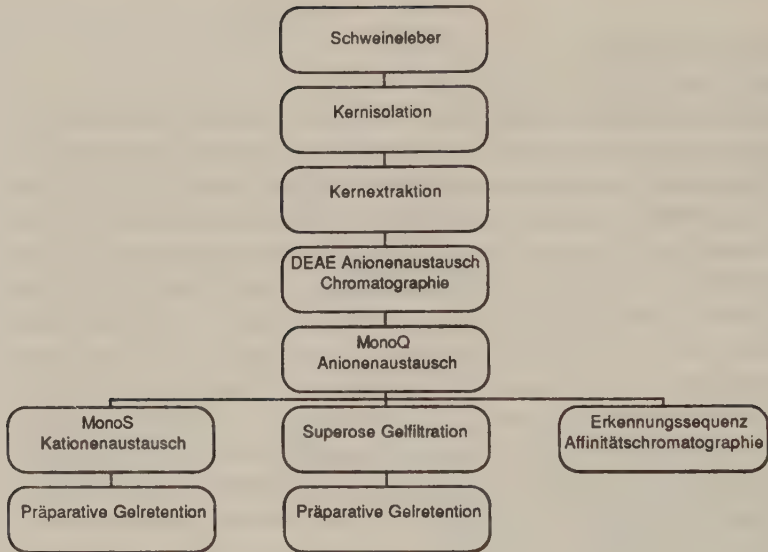


Fig.4.7. Flußdiagramm der Reinigung von NF I aus Schweineleber.

Bis auf die DEAE Chromatographie wurden alle Säulenläufe über die FPLC Anlage gesteuert. Gradienten können über das Zweipumpensystem genau eingestellt werden, was eine hohe Reproduzierbarkeit zu Folge hat. Ferner zeichnen sich die FPLC Medien durch hohe Selektivität, minimale unspezifische Interaktionen, hohe Kapazität und gute Regenerierbarkeit aus. Die Säulenläufe konnten automatisiert und die Aufarbeitung in kurzer Zeit durchgeführt werden.

4.2.1. DEAE Anionenaustausch-Chromatographie

Dieser erste Chromatographieschritt dient vor allem der Entfernung von Nukleinsäuren. Trotz schonender Extraktion enthielten die Kernextrakte zwischen 6% und 11% DNA. Der größte Teil des Proteins lief unter den gewählten Bedingungen (pH 7,5; 100 mM NaCl) durch die Säule hindurch, wobei der DNA-Gehalt auf die Hälfte bis ein Drittel reduziert wurde. Ein Teil des Durchlaufs (ca. 250 mg Gesamtprotein) wurde sofort auf die Mono Q Säule aufgetragen. Dem übrigen Material wurde zu 40% Glycerin zugesetzt. Der Extrakt blieb über Monate bei -80°C stabil und konnte bei Bedarf aufgetaut und aufgearbeitet werden.

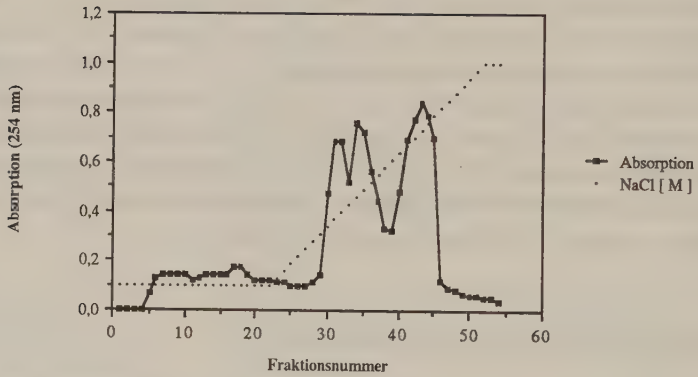
4.2.2. Mono Q Chromatographie (FPLC)

Das Mono Q Material ist ein sehr viel stärkerer Anionenaustauscher als die DEAE Cellulose. So ist es zu erklären, daß NF I, obwohl bei gleichem pH und gleicher Salzkonzentration gearbeitet wurde, an dieses Säulenmaterial bindet. In einem Gradienten von 100 mM bis 1 M NaCl in Puffer A eluiert NF I bei einer Salzkonzentration von 200 bis 400 mM NaCl (Fig.4.8., Bande 1). Ein weiteres, unspezifisch an DNA-bindendes Protein, UBP (Meisterernst et al., 1988), eluiert bei höherem Salzgehalt (Bande 2). Die NF I enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und entweder direkt auf die Affinitätssäule aufgetragen, oder für andere Chromatographieschritte vorbereitet.

4.2.3. Mono S Kationenaustausch Chromatographie (FPLC)

Um NF I an dieses Säulenmaterial binden zu können mußte auf pH 6,0 heruntergegangen werden. Die Trennung wurde in 25 mM Bis Tris Puffer durchgeführt, der Gradient reichte von 0-1 M NaCl. Die Hauptbindeaktivität eluiert zwischen 600 mM und 800 mM NaCl (Fig.4.9.). Bei höherem Salzgehalt eluieren zwei weitere DNA-bindende Proteine. Da NF I bei dem gewählten niedrigen pH seine Bindeaktivität langsam verliert, wurden die Fraktionen sofort nach Beendigung der Trennung gegen Puffer A dialysiert .

a.



b.

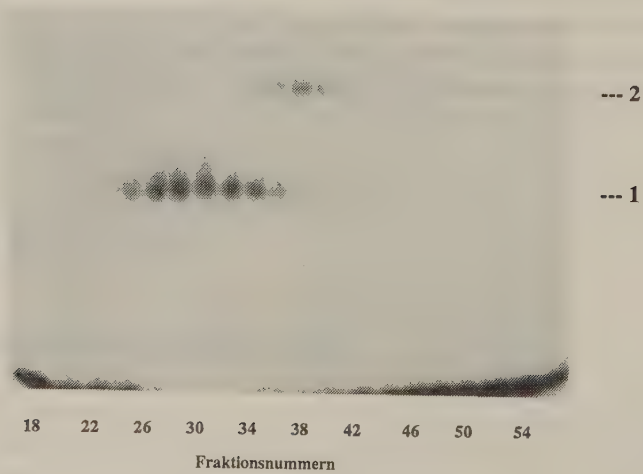
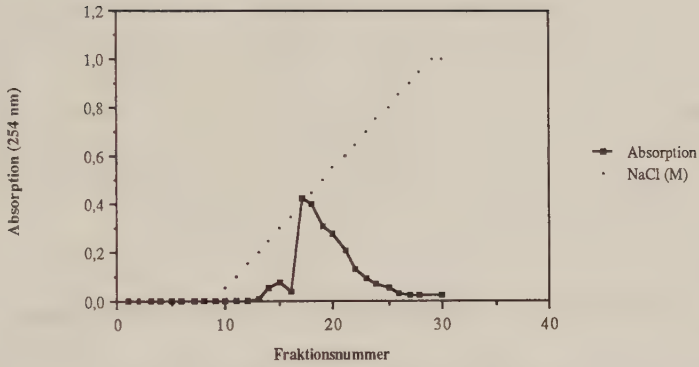


Fig.4.8. Mono Q Chromatographie. **a.** Absorption der Fraktionen bei 254 nm. **b.** Analyse der Fraktionen im Retentionsgel. Jede zweite Fraktion im Gradienten wurde getestet.

a.



b.

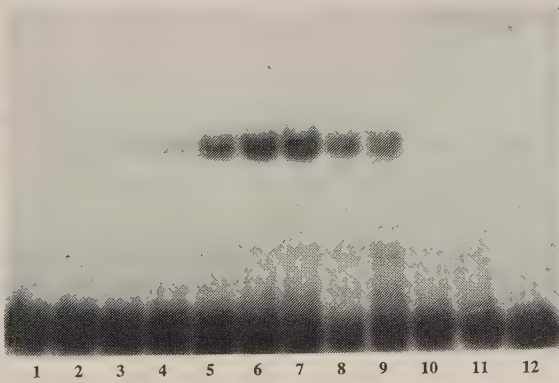


Fig.4.9. Mono S Chromatographie. **a.** Absorption der Fraktionen bei 254 nm. **b.** Test der Fraktionen im Retentionsgel.

4.2.4. Superose Gelchromatographie (FPLC)

Alternativ zur Mono S Chromatographie wurde eine Gelchromatographie der präparativen Gelretention vorgeschaltet. Das Elutionsverhalten von NF I wurde mit dem der Markerproteine verglichen (Tab. 4.1.)

Marker (ml)	Molekulargewicht (kDa)	Retentionsvolumen
Ferritin	450	14-16
Albumin (Rind)	68	17
Albumin (Huhn)	45	18
Cytochrom C	12,5	20,5-21
NF I		17-18

Tab. 4.1. Retentionsvolumina der Eichproteine bei der Superose Gelchromatographie.

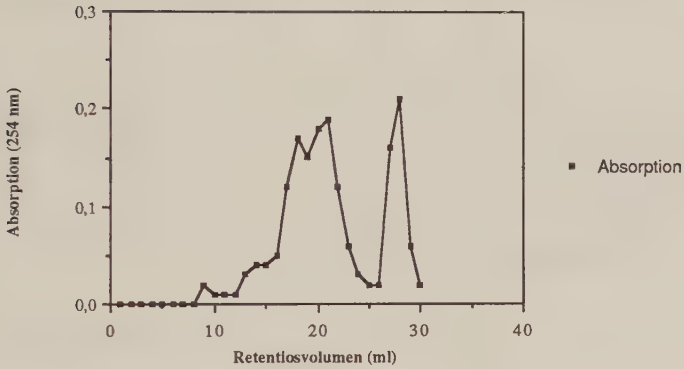
Das Retentionvolumen von NF I entsprach dem der beiden Albuminproben. Dieser Schritt bewirkte eine ca. 3-fache Anreicherung von NF I (Fig.4.10.).

4.2.5. Phenylsuperose (FPLC)

Diese Säule stellt insofern ein Äquivalent zu "reverse phase Säulen" des HPLC Systems dar, als daß sie die Probe nach ihrer Hydrophobizität auftrennt. Die organischen Lösungsmittel werden hier durch stark salzhaltige wässrige Lösungen ersetzt. Dadurch wird es möglich, Proteine nach ihrer Hydrophobizität aufzutrennen und sie dennoch in ihrer nativen Form zu gewinnen.

Hier wurde ein linearer absteigender Gradient (25 ml) von 1,7-0 M Ammoniumsulfat gewählt. Ausgangsmaterial war wiederum über die Mono Q Säule vorgereinigter NF I. Ca. ein Drittel der aufgetragenen Probe blieb überhaupt nicht an den hydrophoben Gruppen hängen und stellt damit eine Fraktion sehr hydrophiler Proteine dar. Die NF I Hauptaktivität eluiert zwischen 350- und 50 mM Ammoniumsulfat. Aus dem Elutionsverhalten kann man schließen, daß NF I vermutlich ein Protein mit vielen hydrophoben Bereichen ist. Mit der NF I Aktivität eluierten weitere, im Gel höher laufende, A₁B₁ bindende Proteine (Fig.4.11.).

a.



b.

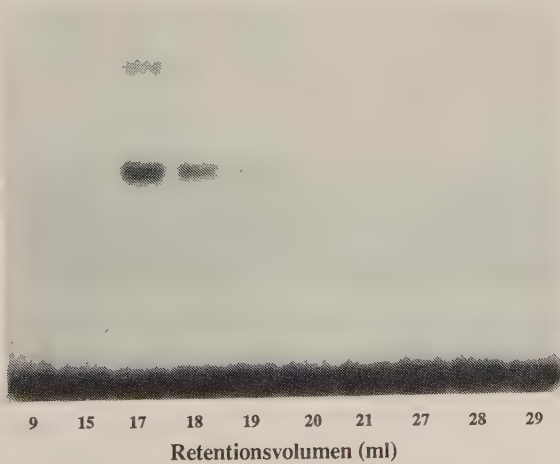
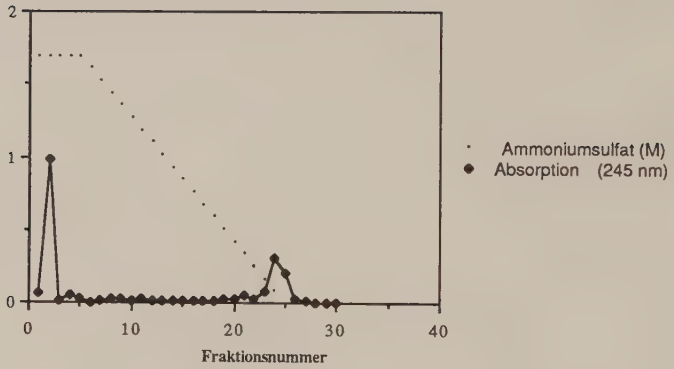


Fig.4.10. Superose Gelchromatographie. **a.** Absorption der Fraktionen bei 254 nm. **b.** Test der Fraktionen in der Gelretention. Es wurden 2 μ l der Fraktionen direkt in den Testansatz eingesetzt.

a.



b.

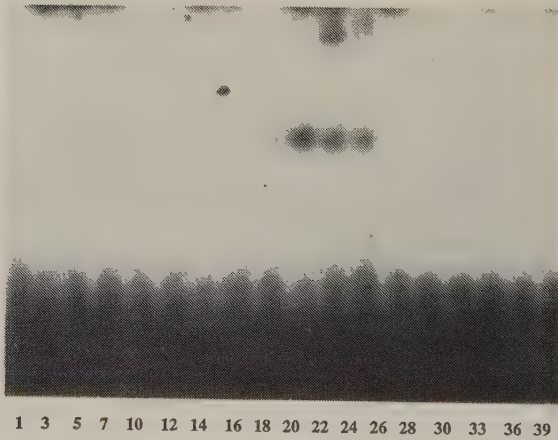


Fig.4.11. Phenylsuperose Chromatographie **a.** Absorption der Fraktionen bei 254 nm. **b.** Test der Fraktionen in der Gelretention. Nach der Chromatographie wurden die Proben gegen Puffer A dialysiert. Pro Ansatz wurden jeweils 4 μ l der Fraktion mit 8 fmol 32 P-

markiertem Oligonukleotid A_1B_1 in Gegenwart von 1 μg poly dIdC in einem Endvolumen von 22 μl inkubiert und dann aufgetragen.

4.2.6. Mono P Chromatofocussierung (FPLC)

Auf diesem Säulentyp ist es möglich, Proteine ihrem isoelektrischen Punkt nach aufzutrennen. Eine Mono Q Fraktion wurde auf die Säule aufgetragen, die zuvor mit 75 mM Trispuffer pH 9,3 äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit Polybuffer 96 pH 6,0 (Pharmacia). Die Fraktionen wurden nach Dialyse gegen Puffer A getestet. NF I spezifische Bindeaktivität eluierte ganz früh im Gradienten bei einem pH von 8,9. Der isoelektrische Punkt von NF I liegt damit im basischen Bereich.

4.2.7. Präparative Gelretention

Es wurde ein Verfahren zur Reinigung von DNA-bindenden Proteinen entwickelt, das auf dem Gelretentionsassay basiert. Das DNA-bindende Protein wird durch die Zugabe des spezifischen Oligonukleotids komplexiert und damit mit stark negativer Ladung versehen. Dadurch wird seine Mobilität im nativen Polyacrylamidgel erhöht. Nicht an DNA-bindende Proteine wandern dagegen nicht oder nur langsam in die Gelmatrix hinein (Fig.4.12.b.)

Hier wurde die Methode zur Reinigung von NF I angewandt. Die Proteinprobe bestand aus über drei Säulen, DEAE, Mono Q und Mono S bzw Superose (siehe 4.2.1.-4.2.4.) vorgereinigtem NF I. Es wurden entweder 3 mm dicke Flachgele oder Röhrchengele mit einem Innendurchmesser von 1,3 cm verwandt. Das Gel bestand, wie aus der analytischen Gelretention für NF I als günstig bekannt, aus 11%igem Polyacrylamid (Vernetzung: Acrylamid/ Bisacrylamid, 44/ 0,8) im Tris Glycin Puffersystem, pH 8,8). Auf ein Retentionsgel wurden maximal 40 pmol NF I aufgetragen. Der Reaktionsansatz enthielt einen vierzig-fachen molaren Überschuß an nicht markiertem Oligonukleotid A_1B_1 , 1 pmol ^{32}P -markiertes A_1B_1 und 150 μg Kompetitor DNA (poly dIdC). Durch den Zusatz von unspezifischer DNA wurde das Eintreten der Probe in die Gelmatrix erleichtert. Der Gellauf wurde wie für die analytische Gelretention beschrieben, durchgeführt. Nach der Autoradiographie wurde die Komplexbande im Gel lokalisiert, ausgeschnitten und der Komplex dann eluiert (Fig.4.12.a.).

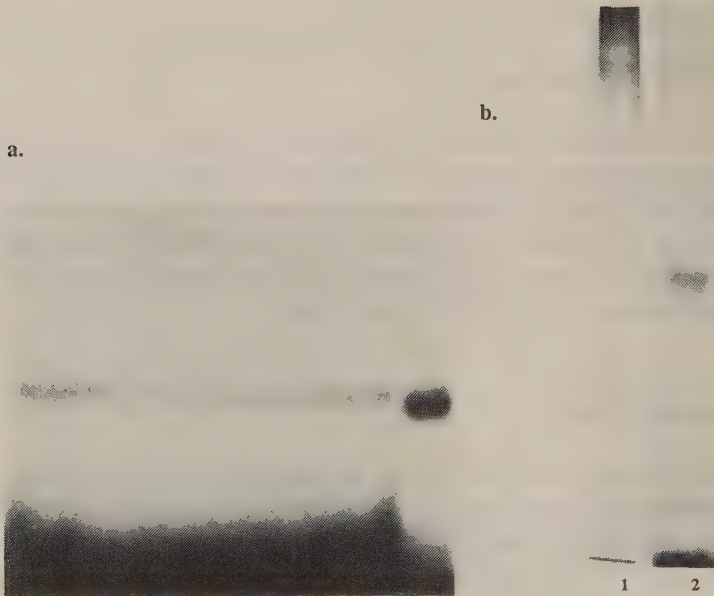


Fig.4.12. Präparative Gelretention. **a.** Autoradiographie eines präparativen 3 mm dicken Gels. Die Kontrollspur enthält ein Aliquot der Probe, inkubiert mit markierter- und unspezifischer-, aber nicht mit unmarkierter spezifischer DNA. **b.** Auftrennung von Mono Q Material auf einem nativen Polyacrylamid Gel. Es wurden 4 μ l der Fraktion mit 8 fmol NF I spezifischem Oligonukleotid und 1 μ g poly dIdC inkubiert und dann aufgetragen. Spur 1, Silberfärbung; Spur 2, Autoradiographie der gleichen Gelspur.

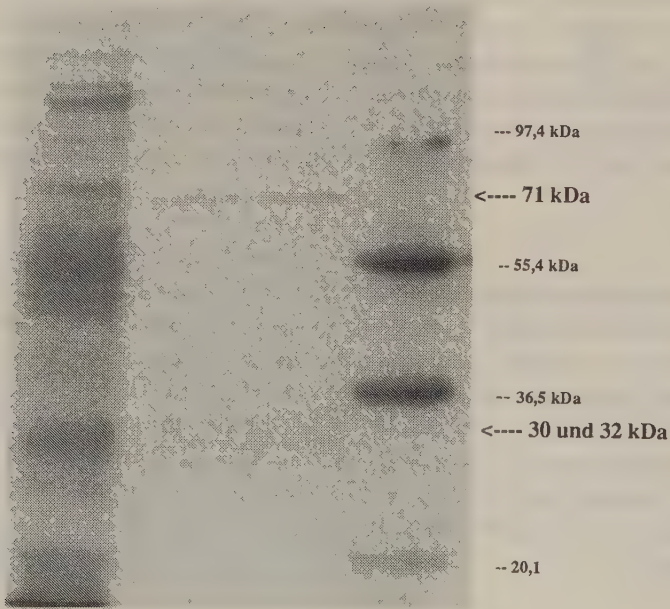
4.2.7.a. Analyse des Molekulargewichts nach der präparativen Gelretention

Das den Protein-DNA-Komplex enthaltende Gelstück wurde zur Elution des Komplexes in SDS haltigen Puffer überführt. Der Zusatz von SDS erhöht dabei die Elutionseffizienz (siehe 4.2.6.b.). Die Elution des Komplexes geschah unter leichter Bewegung durch Diffusion. Das Geleluat wurde dann in der Amicon Diaflo Apparatur eingeengt und das Protein mit Puffer ohne SDS gewaschen und wiederum eingeengt. Fig.4.13.a. zeigt ein Coomassie gefärbtes denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel des gewonnenen Materials. Mehrere Schweinelebern wurden aufgearbeitet und die Geleluate vereinigt. Das aufgetragene Aliquot zeigt 3 Banden. Eine Einzelne, mit einem Molekulargewicht von 72

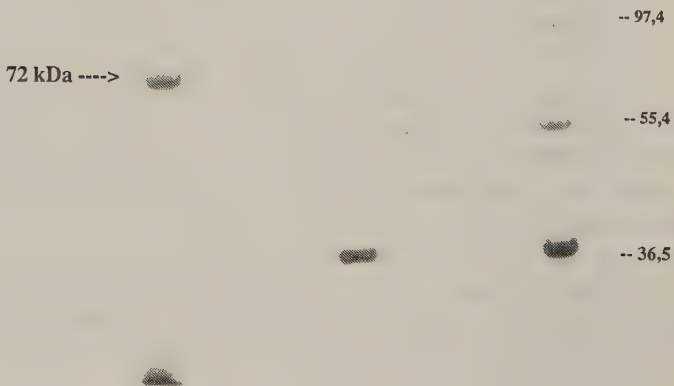
kDa und eine Doppelbande mit 30 und 32 kDa . Bei weiteren Aufarbeitungen wurde jeweils nur eine homogene Proteinbande auf SDS Gelen sichtbar von entweder 32-36 kDa oder 70-72 kDa (Fig.4.13.b.). Die Größenabschätzung führt bei unterschiedlichen Geltypen zu verschiedenen Resultaten. Generell wurde ein geringeres Molekulargewicht mit SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (ca. 32 kDa) und ein höheres mit SDS Harnstoff Gelelektrophorese (ca. 36 kDa) bestimmt. Das Oligonukleotid befindet sich an der Lauffront, was aus der Autoradiographie des Gels, aber auch aus der Silberfärbung hervorgeht.

Fig.4.13.a. Molekulargewichtsbestimmung von NF I nach der präparativen Gelretention auf einem SDS Polyacrylamidgel. Pro Marker wurden 2 µg Protein aufgetragen. Die NF I Menge entspricht ca. 300 ng. Spur 1, Superose Ausgangsmaterial; Spur 2 und 3 gereinigter NF I; Spur 4 Markerproteine. **b.** Analyse des Molekulargewichts von NF I nach der präparativen Gelretention auf einem SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel. Es wurden sowohl von den Eichproteinen als auch von NF I jeweils 1 µg in Auftragspuffer 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann aufgetragen. Das Gel wurde zuerst Coomassie und dann mit Silber gefärbt. Spur 1, NF I Präparation; weitere Spuren, Markerproteine.

a.



b.



4.2.7.b. Gewinnung von hochreinem nativen NF I nach der präparativen Gelretention

Um die Anwendbarkeit der präparativen Gelretention zu erhöhen wurde ein Elutions- und Aufarbeitungsverfahren entwickelt, das die Gewinnung von DNA freiem und damit bindungsfähigem NF I nach der Gelretention ermöglicht. Dazu ist es notwendig, das Protein unter schonenden Bedingungen zu eluieren. Statt 0,1% SDS wurde hier das mildere Detergenz NP 40 in einer geringeren Konzentration (0,01%) zur Elution verwandt. Zur Stabilisierung des Proteins enthielt der Elutionspuffer 10 mg/ml Rinderserumalbumin und 10 % Glycerin. Der Zusatz von NP 40 wirkt ferner der Verklumpung und Adsorption des Proteins an den Gefäßwänden entgegen. Die Elutionseffizienz war höher bei 40°C als bei Raumtemperatur und betrug nach 44 Stunden 15-20 % (Fig. 4.14.).

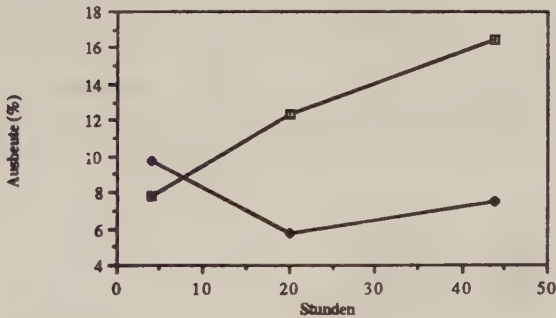


Fig.4.14. Zeitverlauf der Elution der NF I Bindeaktivität aus präparativen Retentionsgelen unter schonenden Bedingungen. Die Elution wurde entweder bei Raumtemperatur oder bei 40°C durchgeführt. Nach 4, 20 und 44 Stunden wurden Aliquots entnommen, über DEAE Säulen wie unten beschrieben chromatographiert und über den Gelretentionstest quantifiziert.

Unter diesen Bedingungen eluiert NF I im Komplex mit dem Oligonukleotid. Es gilt nun, den Komplex zu dissoziieren und das Oligonukleotid abzutrennen. Dies konnte durch DEAE Chromatographie bewerkstelligt werden. Das Geleluat wurde auf eine 1 ml DEAE Säule aufgetragen. Der Durchlauf enthielt geringe Mengen von freiem NF I (Fig 4.15., Spur 3 und 4). Es konnte dann die NF I spezifische Bindeaktivität durch einen

Ammoniumsulfat Stufengradienten (zu 7,5 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung) eluiert werden (Fig.4.15., Spur 5 und 6). Bei dieser Salzkonzentration wird der Protein-DNA-Komplex dissoziiert, das Oligonukleotid bleibt an der Säulenmatrix haften, während das Protein eluiert. Nach Umdialysieren gegen Puffer C stand das hoch gereinigte Protein nun für Bindungstests zur Verfügung.

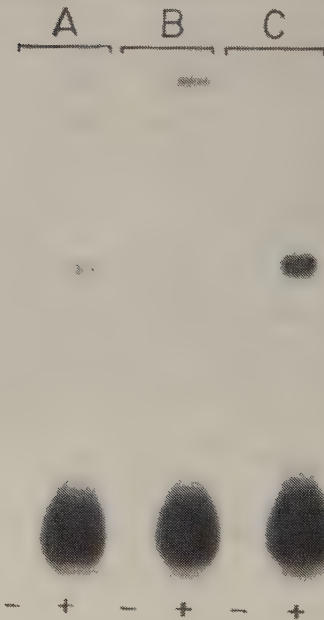


Fig.4.15. Gewinnung von DNA-freiem, bindungsfähigem NF I nach der präparativen Gelretention. Unter A wurden Aliquots des Geleluats vor dem Auftragen auf die DEAE Säule auf ihre Bindungsfähigkeit im Retentionsgel getestet. B, Durchlauf. C, Ammoniumsulfateluat nach dem Umdialysieren gegen Puffer C. Die Tests wurden +, unter Zusatz und -, ohne Zusatz von 8 fmol ^{32}P -markiertem A_1B_1 durchgeführt.

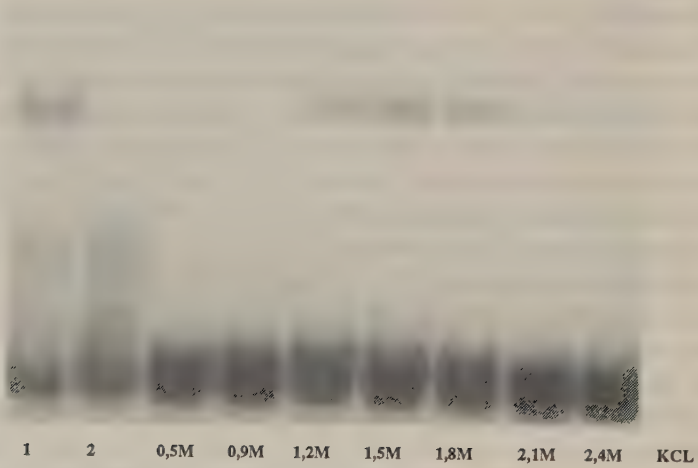
4.2.8. Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie

Diese Trennmethode nutzt, wie auch die präparative Gelretention die spezifische Interaktion von NF I mit seiner DNA-Erkennungssequenz zur Reinigung des Proteins aus. Sie wurde erstmals für die Reinigung des Transkriptionsfaktors SP 1 beschrieben (Kadonaga, 1986). Oligonukleotide, die diese Sequenz tragen (in diesem Fall wurde die hoch symmetrische Sequenz aus dem Maus Adenovirus FL (Antoine et al., 1982; Antoine, 1984; Huber-Mack, 1987) gewählt) werden zunächst aneinander ligiert (Fig.3.3) und die entstandenen

Oligomere dann an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Sequenz des Oligonukleotids L_1L_2 ist in Figur 3.3. abgebildet. Durch die Verwendung von DNA-Molekülen, die mehrfach die Erkennungssequenz tragen, werden die Bindestellen für das Protein zugänglich und die Kopplung an Distanzstücke wird somit unnötig. Wurde die Proteinprobe (Mono Q gereinigtes Material) vor der Chromatographie mit Kompetitor DNA (poly dIdC) inkubiert, so liefen auch unspezifisch an DNA-bindende Proteine mit allen anderen Proteinen durch die Säule ungehindert hindurch. Es konnte nach ausgiebigem Nachwaschen mit Puffer C, enthaltend 500 mM KCl, nun NF I in einem von 500 mM bis 2,5 M KCl reichenden, linearen Gradienten eluiert werden. DNA-bindende Aktivität konnte in den Fraktionen von 1,5 M bis 2,5 M nachgewiesen werden. Die Ausbeute dieses Verfahrens liegt bei 80 %. Es zeigte sich, daß in den stark salzhaltigen Fraktionen die NF I Aktivität, auf Eis aufbewahrt, über Wochen stabil bleibt.

Fig.4.16. zeigt das Elutionsprofil von NF I a., auf einem nativen- und b., auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Das Auftreten der NF I spezifischen Komplexbande korreliert mit einer 32 kDa Bande im SDS Gel bzw. mit einer 36 kDa Proteinbande im SDS Harnstoffgel. Ferner entspricht die auf dem denaturierenden Gel angefärbten Proteinmenge der nach Quantifizierung der Fraktionen erwarteten Menge. Elutionsprofil und Mengenabschätzung deuten daher stark darauf hin, daß NF I nach der Affinitätschromatographie ein Molekulargewicht von 32 kDa aufweist. Es gelang also auch durch den Chromatographie Schritt NF I zur Homogenität zu reinigen.

a.



b.

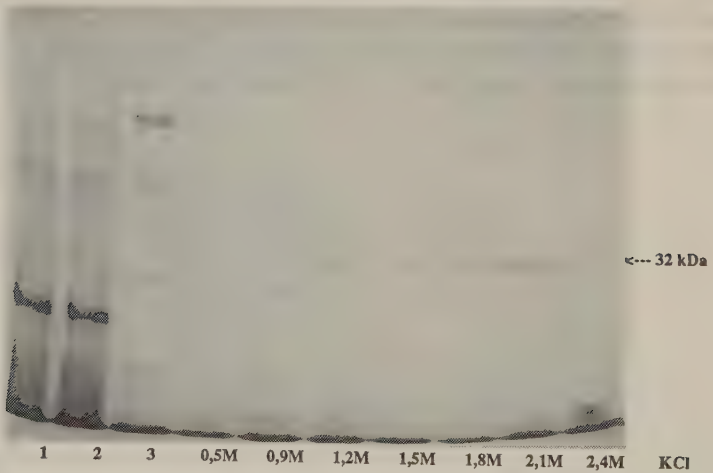


Fig. 4.16. Reinigung von NF I über Erkennungssequenz Affinitätschromatographie. **a.** Test der Fraktionen auf einem nativen Polyacrylamid Gel, (Spur 1, MonoQ-Ausgangsmaterial; Spur 2 Durchlauf) und **b.** auf einem Silber gefärbten SDS Harnstoff Polyacrylamidgel. Spur 1, 5 µg des Mono Q-Ausgangsmaterials; Spur 2, gleiche Menge vom Säulendurchlauf; Spur 3, Marker: 95 kDa 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa.

4.2.9. Zusammenfassung der Reinigung von NF I

In Tabelle 4.2. ist die Reinigung von NF I zusammengestellt. Es gelang auf zwei verschiedenen Wegen homogene Proteinpräparationen zu erhalten. Präparative Gelretention und Affinitätschromatographie sind die potentesten Schritte und führen zu hundert- bis tausend-facher Anreicherung.- Der Verlust von NF I-Aktivität bei den ersten Chromatographieschritten spiegelt eine Degradation des Proteins wider, die auch im Rohextrakt in der gleichen Zeit zu beobachten ist. Der Zusatz von PMSF und Natriummetabisulfid als Proteaseinhibitoren bewirkte keine Erhöhung der Stabilität. Die Ausbeute konnte durch den Einsatz von präparativen FPLC-Säulen erhöht werden.

Die Reinigung über Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie führte zu einer Proteinbande von 32-36 kDa. Eine Bande gleicher Größe trat auch nach der präparativen Gelretention auf. In vielen Präparationen wurde jedoch statt dieser Bande eine circa doppelt so große Bande nach der SDS Gelelektrophorese sichtbar. Über beide Methoden konnte DNA-bindungsfähiger NF I gewonnen werden.

Aus drei Schweinelebern konnten je nach Präparation 5×10^{10} bis 2×10^{11} Kerne isoliert werden. Berechnungen ergeben, daß ein Kern zwischen 50 000 und 100 000 Molekülen von NF I enthält. Dieses Protein macht ca. ein Vierzigtausendstel des Kernproteins aus. Geht man davon aus, daß das Kernprotein ein Zehntel des Zellproteins ausmacht, so war insgesamt eine 400 000-fache Anreicherung von NF I nötig, um dieses Protein in homogener Form zu erhalten.

	Gesamtprotein [mg]	Gehalt an NF1 [nmol]	Spezifische Aktivität [pmol/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung
Kernextrakt	22700	15	0.7	100	1
DEAE-Chromatographie	3100	11	3.5	72	5
Mono-Q Chromatographie	296	3.2	11	21	3.1
DNA-Affinitätschromatographie	0.1	2.8	28000	19	2500
Mono-S Chromatographie	72	2.9	40.3	19	4.1
Präparative Gelretention	0.045	1.3	28000	8.7	700

Tab. 4.2. Anreicherungsschema für NF1

4.2.9. Westernblots mit NF I Antiserum

Eine Maus wurde mit gereinigtem (Gelretention) NF I immunisiert und vier mal geboostert. Die erste Probe enthielt 15 µg NF I, alle weiteren 5- 10 µg. Jeweils 4- 6 Tage nach einer Injektion wurden Serumproben entnommen und die Immunantwort im Westernblot analysiert. Dazu wurde DEAE Durchlauf, pro Spur 0,5 pmol, auf ein SDS Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde auf einen Nitrocellulosefilter geblottet, der Blot in Streifen geschnitten und mit verschiedenen Serumverdünnungen inkubiert. Antikörper Reaktionen konnten über einen zweiten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti- Antikörper durch eine enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden.

Schon nach dem ersten Boostern wurden zwei Banden von 35- 40 kDa und von ca. 25 kDa angefärbt und waren bis zu einer 1/ 5000 Verdünnung sichtbar. Nach dem zweiten Boostern erschien nur noch die obere Bande. Der letzte Blot wurde nach der vierten Nachimmunisierung durchgeführt. Wie Fig.4.17. zeigt, wird nun eine ca. 72 kDa große Bande neben der 35- 40 kDa Bande angefärbt. Das Kontrollserum (Serum einer nicht immunisierten Balb c Maus) zeigt keine Reaktionen mit der DEAE Fraktion.

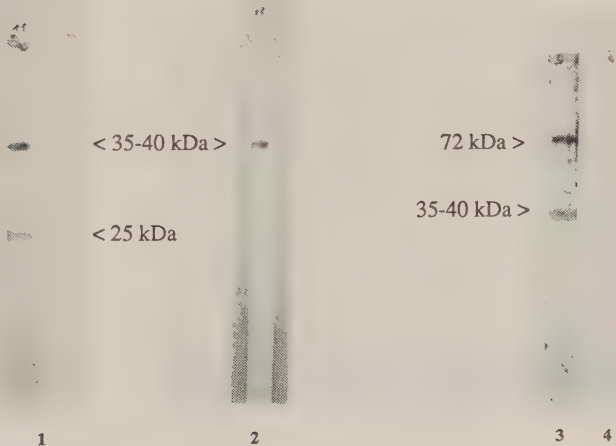


Fig.4.17. Westernblots mit NF I Antiserum. Gezeigt sind geblottete DEAE Fraktionen, die mit 1/ 200 Verdünnungen des Serums behandelt wurden. Spur 1, Serum nach erstem-, Spur 2 nach zweitem- und Spur 3 nach viertem Boostern. In Spur 4 wurde ein Nitrocellulosestreifen mit Kontrollserum behandelt.

Weitere Untersuchungen konnten leider nicht gemacht werden, da die Maus 5 Tage nach der fünften Injektion starb. Ein weiterer Versuch, 3 Mäuse mit affinitätsgereinigtem Material zu immunisieren, endete wiederum mit dem Tod der Mäuse. In ersten Westernblots wurde wiederum eine 35-40 kDa große Bande angefärbt (Rogge, persönliche Mitteilung).

4.2.11. Analyse der DNA-Bindung mit hochreinem NF I.

4.2.11.1. Spezifität der Bindung

Mit hochreinem NF I konnte hier die gleiche Spezifität der DNA-Bindung von NF I wie im Rohextrakt festgestellt werden. Die Bindung an das die NF I Bindestelle tragende Oligonukleotid konnte nur durch das unmarkierte homologe, aber nicht durch drei verschiedene heterologe DNA-Fragmente kompetetiert werden. Die Fig.4.18. zeigt dies für Gelretention gereinigtes Protein. Selbes gilt aber auch für affinitätsgereinigtes Material.

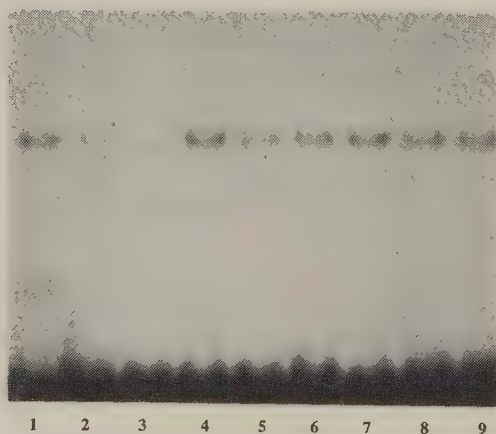


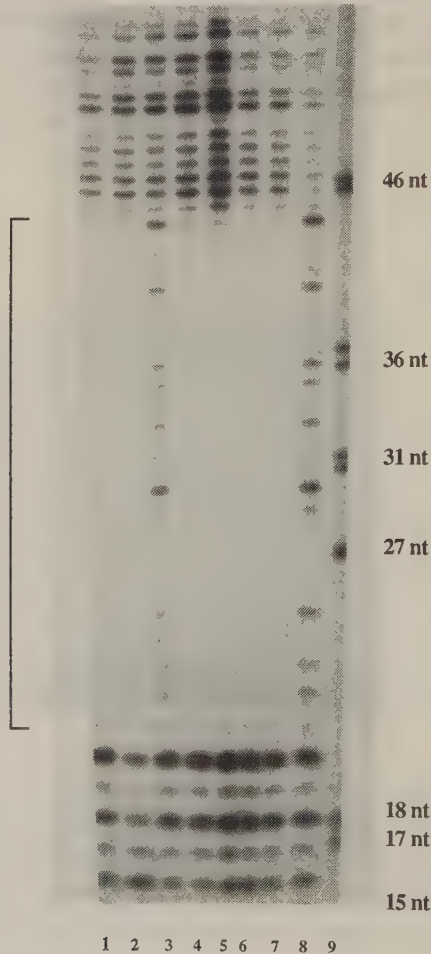
Fig.4.18. Kompetitionstest. Gleiche Mengen über die Gelretention gereinigten NF I wurden in Spur 1, mit dem radioaktiv markierten NF I spezifischen Oligonukleotid A_1B_1 allein und in den weiteren Spuren unter Zusatz von 25 bzw 125-fachen Überschüssen verschiedener nicht markierter Kompetitorfragmente inkubiert. Spur 2 und 3, homologes Oligonukleotid A_1B_1 ; Spur 4 und 5, K_1K_2 ; Spur 6 und 7, myc 1,2.

4.2.10.2. DNase I Footprint Analyse

Es wurde untersucht welcher DNA-Sequenzbereich auf dem Adenovirus 2 ITR durch Bindung von reinem NF I vor Verdau mit DNase I geschützt ist. Als DNA-Probe wurde ein kloniertes, 156 bp langes Fragment benutzt, das die ersten 70 Basenpaare des Adenovirus ITR beinhaltet (Gröger, 1984).

Der durch NF I geschützte Bereich erstreckt sich von Position 21 bis 44 des ITR (Fig. 1.1.; Fig. 4.19.). Es reichten 5 fmol NF I aus um bei einer vergleichbaren Menge Fragment einen Footprint erkennbar zu machen (Spur 4). Der Zusatz von Kompetitor DNA (Spur 4/6; 5/7) bewirkt keine Änderung des Musters. Unabhängig von der Reinigungsmethode wurde der selbe Footprint erhalten.

Fig.4.19. DNase I Footprint mit reinem NF I. Jeder Ansatz enthielt 5 fmol 32 P-markiertes Fragment. Spur 1 und 2, unterschiedliche Mengen von NF I, gereinigt über Affinitätschromatographie wurden zugesetzt (Spur 1, 30 fmol; Spur 2, 260 fmol). Spur 3-7 enthielten unterschiedliche Mengen von über die Gelretention gereinigtem NF I (Spur 3, 2 fmol; Spur 4 und 6, 5 fmol; Spur 5 und 7, 18 fmol) In den Ansätzen von Spur 1, 2, 7 und 8 war zusätzlich 100 ng unspezifische DNA (poly dIdC) enthalten. Die Bindereaktion wurde in Puffer A in einem Endvolumen von 22 μ l durchgeführt. Die Spur 9 zeigt den Größenmarker. Die Klammer deutet den vor DNase I-Verdau geschützten Bereich an.



4.2.11.3. Proteasebehandlung von hochgereinigtem NF I

Über die Erkennungssequenz-Affinitätssäule gereinigter NF I wurde mit spezifisch schneidenden Proteasen behandelt. Bis zu hundertfache Gewichtsüberschüsse an Proteasen wurden zugesetzt. Die Tests wurden unter den Bedingungen der Gelretention, d.h. in Puffer A durchgeführt, um die Reaktionsprodukte anschließend im nativen Gel analysieren zu können. Die NF I Probe wurde zunächst 1 Stunde bei 25°C inkubiert, dann wurde das NF I-spezifische Oligonukleotid zugesetzt und nach weiteren 25 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze aufgetragen. Aus einem Kontrollansatz geht hervor, daß NF I während der langen Inkubationszeit keine Bindungsaktivität verliert.

Wie Fig. 4.20. zeigt, gelang es nur mit Trypsin das Komplexsignal zu schwächen. Diese Protease wurde anschließend zur Spaltung von NF I zur Sequenzierung des Proteins eingesetzt. Proteaseresistente Abbaubanden mit Bindungsaktivität wurden nicht beobachtet.

a.

b.

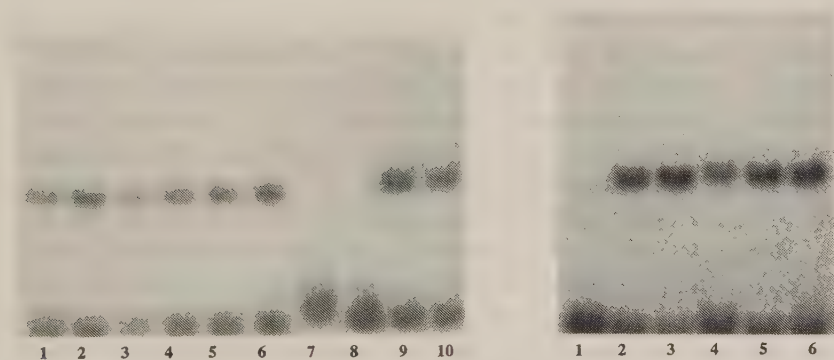


Fig 4.20. Proteasebehandlung von NF I unter nativen Bedingungen. Pro Test wurden 10 ng NF I und unterschiedliche Mengen Protease in einem Endvolumen von 20 µl in Puffer A eingesetzt. **a.** Spur 1-3: Collagenase 1 µg, 100 ng, 10 ng; Spur 4-6: Arg C Protease 1 µg, 100 ng, 10 ng; Spur 7 und 8: Jeweils 1 µg von Collagenase resp. Arg C Protease wurden mit dem Oligonukleotid, ohne NF I inkubiert. Spur 9 und 10: NF I wurde ohne Protease mit dem Oligonukleotid inkubiert. Spur 9, bei 25°C, Spur 10, auf Eis. **b.** Spur 1-3 Trypsin 1 µg, 100 ng, 10 ng; Spur 4-6: V8 Protease.

4.3. Peptiderzeugung, Auftrennung und Sequenzierungsergebnisse

Es wurden verschiedene Anläufe genommen, um Proteinsequenz-Information von NF I zu erhalten. Zunächst wurde versucht, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Beyreuther (Köln) das Protein direkt anzusequenzieren. Es stellte sich leider heraus, daß der Aminoterminus des Proteins blockiert war, was eine Sequenzierung unmöglich machte. Daraufhin wurde versucht, über enzymatische Hydrolyse und Bromcyan-Spaltung Peptide zu erzeugen, diese mit Hilfe von HPLC aufzutrennen, und dann zu sequenzieren. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Lottspeich (Genzentrum, München). Als erstes wurde ein Verdau von NF I mit V8 Protease probiert. Es wurden jedoch auch unter denaturierenden Bedingungen (in Anwesenheit von 600 mM Harnstoff) keine Hydrolyseprodukte erzeugt. Es konnten weder in der Gelchromatographie noch im SDS Gel Unterschiede gegenüber dem Ausgangsmaterial festgestellt werden. Auch Versuche, natives Protein mit höheren Proteasekonzentrationen zu verdauen, zeigten in der Gelretention keine Veränderungen im Bandenmuster.

Mit Trypsin dagegen gelang die spezifische Hydrolyse. Es wurden 150 pmol NF I (Reinigung über die Gelretention) mit 200 ng Trypsin behandelt. Das Ausgangsmaterial ist in Figur 4.13.b. sichtbar. Durch "reverse phase" Chromatographie wurden annähernd 100 Peaks aufgetrennt (Fig.4.21.). Die große Anzahl läßt vermuten, daß das Peptidgemisch auch partielle Spaltprodukte enthielt. Es war sehr schwierig die einzelnen Peaks sauber voneinander zu trennen. Nur aus den Peaks Y und Z konnten Sequenzinformationen gewonnen werden (Tab 4.3.).

Die sich anschließende Bromcyan-Spaltung wurde mit NF I Material durchgeführt, das über Affinitätschromatographie gereinigt worden war. Bromcyan spaltet spezifisch nach Methionin im sauren Milieu. Die Methioninreste werden dabei in C terminale Homoserin Lactone umgewandelt. Es wurden 500 pmol NF I eingesetzt und die Spaltprodukte über eine Aquapore Säule (Applied Biosystems) aufgetrennt (Fig.22.). Aus Peak D konnte direkt Sequenzinformation gewonnen werden, auch Peak A und E ließen sich ansequenzieren. Auf Grund der geringen Auflösung von Peak I und II wurden diese Fraktionen getrennt voneinander mit Trypsin nachverdaut. Die Auftrennung auf einer MZ Mikro Säule (MZ Analysentechnik) lieferte einige saubere Peptide, die sich gut sequenzieren ließen (Peak F, G, H, I und J in Fig.23.). Dabei entspricht die Sequenz aus Peak H z.T. der von Peak E (beide Sequenzen stammen vom selben Peptid). Aus dem Vergleich der Spektren von 206 nm (Absorption der Peptidbindung) und 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren, vor allem von Tryptophan). können Abschätzungen über die Reinheit der Peptide gewonnen werden. Die gewonnene Sequenzinformation ist in Tab.4.3., zusammengestellt.

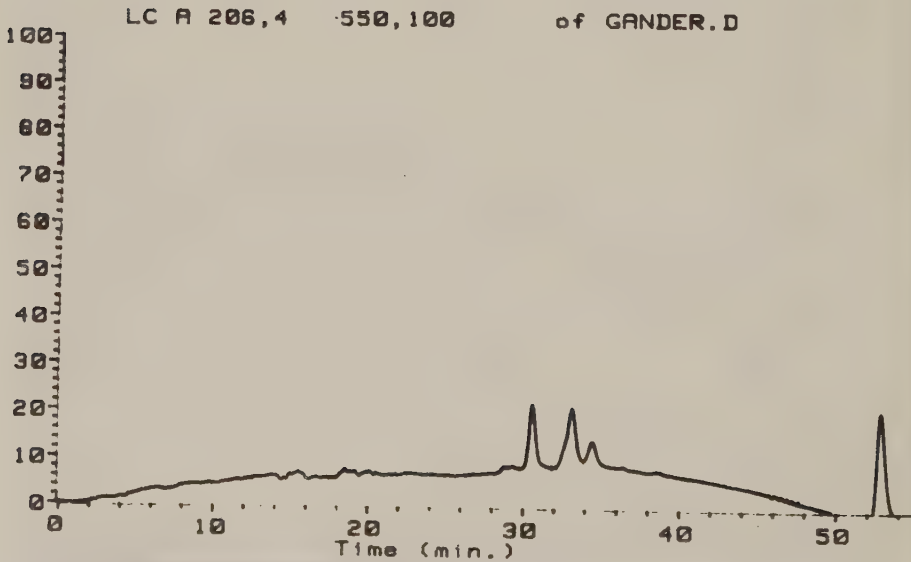
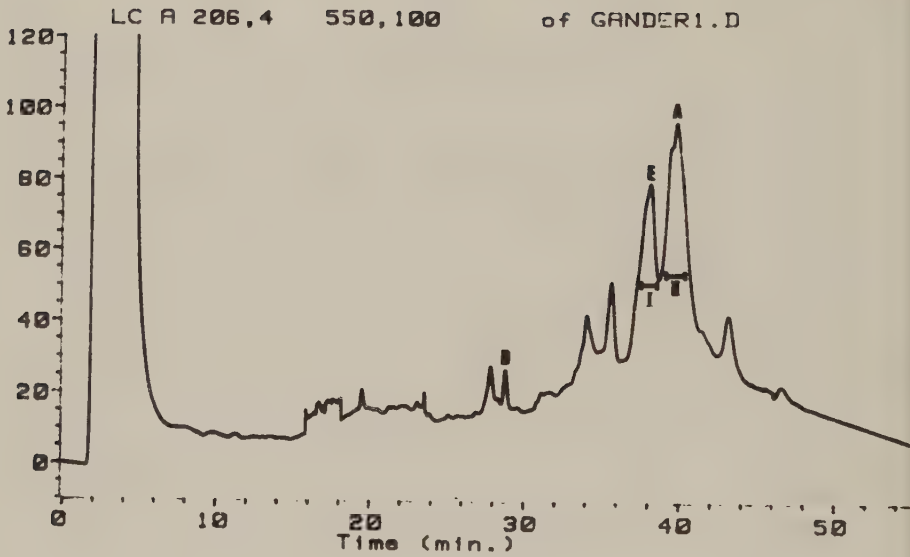


Fig. 22. Auftrennung der NF I Bromcyan-Spaltfragmente über eine Aquapore Säule. Die Flußrate betrug 0,7 ml/ min. Die Absorption bei 206,4 nm wurde gemessen. Die untere Kurve zeigt das Profil des Blindlaufs. Der Gradient reicht von 0-65 % Acetonitril.

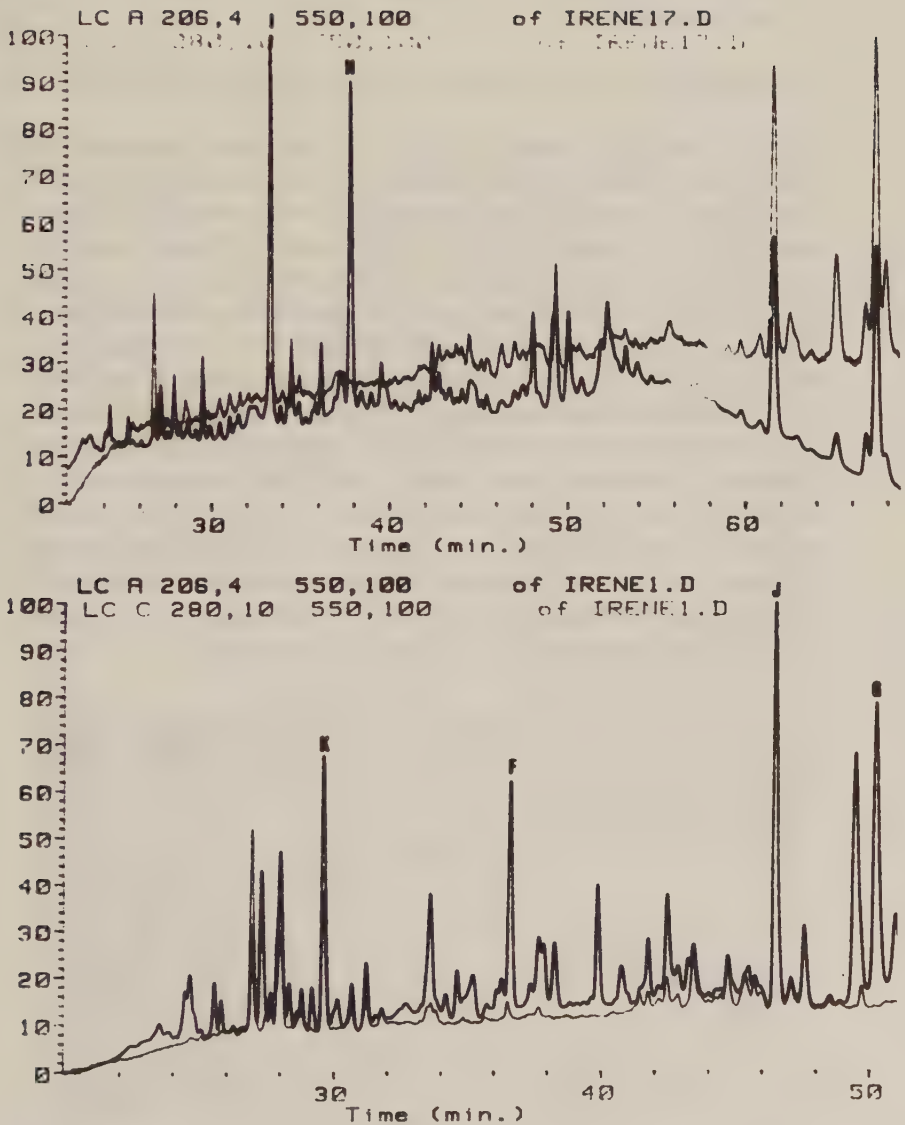


Fig. 23. Trennung der mit Trypsin verdauten Peaks I und II über eine MZ Mikro-Säule. Die Absorption bei 206 und bei 280 wurde gemessen. Der Gradient reichte von 0-65 % Acetonitril. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Die Fraktionen wurden per Hand gesammelt. Das obere Chromatogramm zeigt die Nachspaltung von Peak I (Fig. 21), das Untere die von Peak II.

4.4. Ansatz zur Klonierung

4.4.1. Durchmusterung von cDNA Banken

Es wurden, in Zusammenarbeit mit Dr. C. Donath, zwei Genbanken, eine Schweineleberbank und eine menschliche Leberbank durchmustert. Beide cDNA Banken waren im Expressionsvektor λ gt11 kloniert. Nach Induktion mit IPTG können β Galaktosidase Fusionsproteine exprimiert werden. Der Vektor wurde ursprünglich konstruiert um Genbanken mit Antikörpern zu durchmustern (Young und Davis, 1983). Hier wurde versucht, die DNA Bindung von NF I auszunutzen, um das NF I Gen zu finden (South Western- Technik). Es wurden jeweils $7,5 \times 10^5$ Phagenplaques durchmustert. Nach dreistündiger Inkubation wurde die Expression durch Auflegen von IPTG getränkten Nitrocellulosefiltern induziert. Der erste Filter wurde nach drei Stunden abgezogen und der Vorgang dann mit einem zweiten Filter wiederholt. Die Filter wurden anschließend gewaschen und dann mit Klenow markierten Oligonukleotiden, die die NF I Bindestelle tragen (A_1B_1), inkubiert. Nach dem Wegwaschen überschüssigen Oligonukleotids wurden die Filter exponiert. Figur 23 zeigt die Autoradiographie zweier Filterabzüge von einer Platte. Einkreist sind doppelpositive Signale. Pro Bank wurden 20 Plaques ausgewählt, ausgestochen und die Phagen aufgereinigt. Nach drei Runden wurden Phagenstocklösungen angelegt.

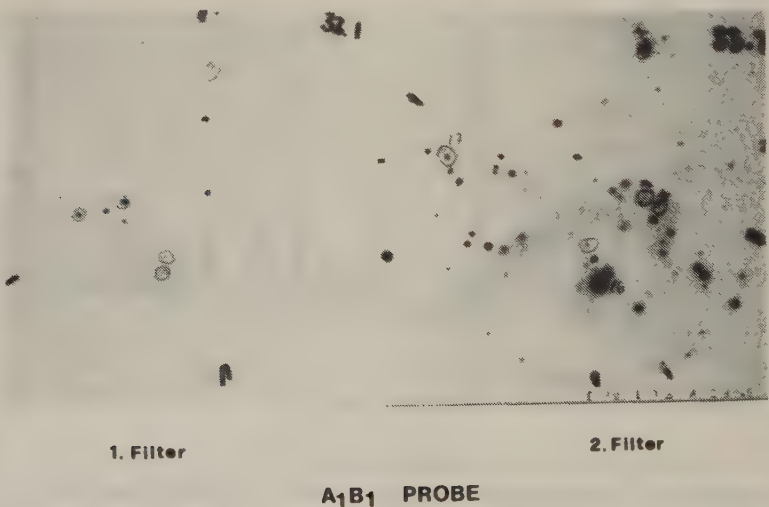


Fig.4.24. Durchmusterung von λ gt 11 Klonen mit der South Western Technik. 1. und 2. Filterabzug einer Platte nach Behandlung mit dem Oligonukleotid A_1B_1 sind abgebildet. An DNA bindende Klone sind eingekreist.

4.4.2. Test der Fusionsproteine im Gelretentionsassay

Von einer Mischpopulation der über die South Western Technik gefundenen Klone ausgehend, wurde versucht, DNA Bindungsaktivität der Fusionsproteine nachzuweisen. Flüssig Bakterienlysate wurden 10 Minuten lang mit IPTG stimuliert, die Bakterienreste abzentrifugiert und die Überstände zunächst direkt im Gelretentionstset analysiert. Eine 10 minütige Induktion der Expression von einem in λ gt 11 klonierten T-Antigen-Fusionsproteins führte zu einem starken Signal im Westernblot mit monoklonalen T Antigen-Antikörpern (T.Dobner, persönliche Mitteilung). Auf diese Weise konnten keine zusätzlichen Banden gegenüber Wildtyplysaten festgestellt werden. Als nächstes wurde versucht, DNA Bindungsaktivität über die NF I spezifische Affinitätssäule anzureichern. Die Lysate wurden dazu nach der Induktion mit Proteaseinhibitoren versetzt und sofort auf eine neue Affinitätssäule aufgetragen. Es wurde weitgehend analog zur Reinigung von NF I verfahren. Die Elution wurde in einem Stufengradienten von 0,7 M, 1,5 M und 2,5 M KCl durchgeführt (Fig.4.24. a.). Eine Vielzahl von Banden eluierten mit der höchsten Salzkonzentration. Die Banden blieben bei Zusatz von 1 μ g poly dIdC erhalten. Ferner konnte für diese Proteine in Kompetitionsversuchen (Fig.4.24.b.) eine gewisse Spezifität für die NF I Erkennungssequenz festgestellt werden. Der Kontrollversuch mit λ gt 11 Wildtyp ist in Figur 4.24.c. dem gegenübergestellt. Nur die Bande 4 ist auch bei Hochsalz-Eluaten von Wildtyplysaten sichtbar. Auch diese Bande zeigt eine Präferenz für das NF I spezifische Oligonukleotid. Die Bande 1 entspricht der Auftragsstelle; bei niedriger prozentigen Gelen wandert der Komplex 1 jedoch in die Gelmatrix hinein (hier nicht gezeigt).

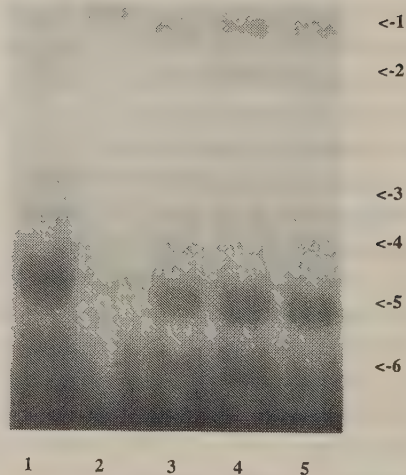
Einzeluntersuchungen der Klone und Footprintassays sollten weitere Aufschlüsse über die Spezifität der Fusionsproteine bringen.

Fig. 4.25. Test auf Fusionsproteine mit dem Gelretentionsassay. Jeder Ansatz enthielt 1 μ g poly dIdC. **a.** Analyse der Fraktionen von der Affinitätssäule. Spur 1, Durchlauf; Spur 2, 0,7 M KCl Eluat; Spur 3, 1,5 M- und Spur 4, 2,5 M Eluat. Gleiche Mengen wurden mit 40 fmol markiertem E_1E_2 inkubiert. **b.** Kompetitionsversuch mit dem 2,5 M Eluat. Spur 1 ohne Kompetitor; Spur 2 bis 5 Kompetitionen mit 5 fachen Überschüssen von den Oligonukleotiden von E_1E_2 , vk, TK und K_1K_2 . **c.** Spur 1-3: 2,5 M Eluat der gefischten Klone; Spur 4-6: 2,5 M Eluat des Wildtypkontroll-Lysats. Spur 1 und 4, ohne Zusatz von Kompetitor. Spur 2 und 4 Kompetition mit E_1E_2 und Spur 3 und 6 Kompetition mit dem vk Oligonukleotid.

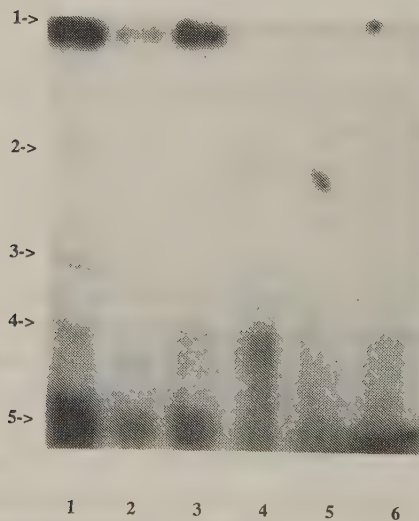
a.



b.



c.



5. Diskussion

In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise dafür, daß grundlegende zelluläre Prozesse, wie Replikation und Transkription durch sequenzspezifisch an DNA bindende Proteine vermittelt werden (Dynan und Tjian, 1985). Untersuchungen von Faktoren, die durch Bindung an Promotoren und Enhancer die Transkription steuern, wurden zumeist von der DNA Seite aus begonnen. So wurden Gene isoliert, die für Steroidhormone und Onkogenprodukte kodieren und solche, die für Faktoren kodieren, die die Expression von Proteinen während der Entwicklung steuern. Bis heute konnten jedoch nur wenige der zugehörigen Proteine biochemisch charakterisiert werden.

Über Faktoren, die in den Replikationsprozess involviert sind, ist in eukaryotischen Zellen weitaus weniger bekannt. Ein Grund dafür liegt darin, daß Mutationsanalysen nicht durchgeführt werden können, da Veränderungen in den entsprechenden Genen vermutlich letal sind. Ferner führte die Suche nach zellulären Ursprungsorten der Replikation erst in jüngster Zeit zu einigen Erfolgen (Holst et al., 1988). Das bisher am Besten untersuchte eukaryotische Protein, das zumindest an der Replikation von viraler DNA beteiligt ist, ist bisher NF I. Verschiedene Arbeitsgruppen haben dieses Protein aus HeLa Zellen isoliert. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen, das zugehörige Gen zu klonieren.

Sowohl für die biochemische Charakterisierung als auch für die Klonierung der in geringen Konzentrationen auftretenden, sequenzspezifisch an DNA bindenden Proteine ist es wichtig, hocheffiziente Reinigungsmethoden zu entwickeln, die zu homogenen Proteinpräparationen führen.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode beschrieben, die die selektive Reinigung von sequenzspezifisch an DNA bindenden Proteinen erlaubt. Sie nutzt die DNA-Bindung und damit verbunden, die erhöhte Mobilität der Protein-DNA-Komplexe gegenüber freiem Protein in nativen Polyacrylamidgelen zur Reinigung aus (Präparative Gelretention). Der von Fried und Crothers zur Analyse der lac Repressor-Operator-Interaktion in Rohextrakten entwickelte Test wurde dazu umgearbeitet. Statt DNA-Fragmenten wurden erstmals kurze, die Erkennungssequenz beinhaltende, synthetische Oligonukleotide zur Erzeugung von Protein-DNA-Komplexen eingesetzt. Es wurden Elutionsverfahren entwickelt, durch die homogene Proteinpräparationen zur Aminosäure-Sequenzanalyse und zur Durchführung von funktionellen Tests ohne Störung durch Fremdaktivitäten gewonnen werden können. Im Gegensatz zur Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie kann die präparative Gelretention direkt, ohne weitere

Vorbereitungen wie Klonierung von oligomeren Bindestellen, bzw. Ligation von Oligonukleotiden und Kopplung der DNA an Bromcyan-aktiviertes Trägermaterial, durchgeführt werden. - Tritt die Problematik auf, daß Proteine mit ähnlicher Affinität an eine bestimmte Sequenz binden, so wird die Gelretention der Affinitätschromatographie überlegen sein. Während sich diese Faktoren im Elutionsprofil überlappen, können sie bei unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit im nativen Gel aufgetrennt werden. Zum Beispiel führte die Auftrennung von HeLa Kernextrakten über Säulen, die die NF I bzw. CTF DNA-Erkennungssequenzen tragen, zur gemeinsamen Elution einer Vielfalt von Polypeptiden, die in nativen Gelen auftrennbar sind.

Zur Reinigung von NF I wurde hier Schweineleber als Ausgangsmaterial gewählt. Dieses Gewebe enthält relativ große Mengen an NF I, ist kostengünstig und in beliebiger Menge leicht zu erhalten.

Dieses Protein gleicht seinen HeLa Zell-Äquivalenten in Bindungsspezifität und Footprint-Muster. Im funktionellen Test konnte ferner von M. Meisterernst gezeigt werden, daß NF I aus Schweineleber ebenfalls die Initiation der Replikation von Adenovirus-DNA stimuliert (Meisterernst et al., eingereicht).

Im Gegensatz zu NF I aus HeLa Zellen weist NF I aus Schweineleber jedoch ein anderes Bandenmuster in nativen und denaturierenden Gelen auf. NF I Präparationen aus HeLa Zellen zeigen in der Gelretention mehrere Banden, während der Faktor aus Schweineleber nur eine Bande aufweist. Bisher wurden Molekulargewichte von 47 kDa, 52-66 kDa und 160 kDa für den menschlichen NF I über verschiedene Reinigungsverfahren gefunden und veröffentlicht. Als Ursache für die unterschiedlichen Resultate wurde proteolytischer Abbau vermutet. Während der Reinigung von NF I aus Schweineleber wurde in der Gelretention nur schwach ein Abbauprodukt sichtbar. Hochgereinigter NF I lief in nativen Gelen auf gleicher Höhe wie NF I-DNA-Komplexe aus Rohextrakten. Allerdings bleibt offen, ob in den anderthalb- bis zwei Tagen, in denen die Kernextrakte präpariert werden, Proteasen dieses Protein auf ein relativ stabiles Produkt abgebaut haben.

Die Isolation von NF I aus Schweineleber führte über die zwei unterschiedlichen Methoden, präparative Gelretention und Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie, zu einem Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 32-36 kDa, wobei aber NF I nach der präparativen Gelretention in vielen Fällen auch als Protein von circa doppelter Größe eluierte. Gemäß dem Retentionsvolumen von NF I bei der Superose Gelfiltration wäre ein Molekulargewicht von 60-70 kDa zu erwarten gewesen. Eine über diese Säule vorgereinigte Fraktion zeigte nach anschließender präparativer Gelretention sowohl eine

30/32 kDa Doppelbande als auch eine 70-72 kDa große Bande. Ein vergleichbares Muster wurde im Westernblot nach Anfärbung mit NF I-Antiserum sichtbar.

Vielleicht besteht das 70-72 kDa Protein, was immer erhalten wurde, bevor die Aufarbeitung zeitlich gestraft worden war, aus einem NF I Dimer, welches bei der Alterung des Extraktes oder während der Elektrophorese fest miteinander verbunden wurde. Möglicherweise geschah dies durch Oxidation. Die während der Aufarbeitung anwesenden Konzentrationen an DTT bzw. DTE (1-5 mM), die üblicher Weise bei Proteinreinigungen eingesetzt werden, mögen nicht ausgereicht haben, um die SH-Gruppen zu schützen, zumal diese Substanzen bei einem pH von 7,5 (Standard-Aufarbeitungspuffer) nicht ihr Wirkungsoptimum (pH>8,5) haben (Jocelyn, 1987). Gefahrenquellen für Oxidationsprozesse birgt des weiteren die Elektrophorese. Hier könnte es einmal zu Photooxidation kommen, die durch Farbstoffe wie z.B. dem im Auftragspuffer enthaltenen Bromphenolblau katalysiert werden (Brandt, 1977). Ferner könnten Spuren von APS, das zur Polymerisation der Gele eingesetzt wurde, oxidativ wirken (Lou et al., 1987).

Beobachtungen des biochemischen Verhaltens lassen vermuten, daß NF I ein sehr kompaktes Protein mit stabiler Tertiär- bzw. Quartärstruktur ist (s.u.). Wie schon in der Einleitung beschrieben, legt ferner die hohe Symmetrie der Erkennungssequenz nahe, daß NF I als Dimer bindet.

Eine kompliziertere Erklärung der Molekulargewichtsdivergenz ergibt sich aus Versuchen von Chodosh et al. (1988a). Nach Auftrennung von HeLa-Zell-extrakten über eine Phosphocellulose-Säule wurde eine Aufspaltung von NF I in zwei Untereinheiten, NF IA und NF IB festgestellt. Für die NF IB-Untereinheit allein wurde sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität beschrieben. Demnach könnte es sich bei der 70 kDa Bande also auch um ein Heterodimer handeln. Dafür spricht die Situation im Westernblot. Zunächst wird hier die kleinere Bande von ca. 35 kDa angefärbt. Erst nach mehrfachem Immunisieren enthält das Serum Antikörper, die die 72 kDa Bande erkennen. (Das geringfügig höhere Molekulargewicht im Westernblot rührt vermutlich von dem höheren Salzgehalt der aufgetragenen DEAE-Durchlauf-fraktion her.)

Eine weitere Möglichkeit ist, daß durch den hohen Salzgehalt bei der Elution von der Affinitätssäule das Dimer in seine Untereinheiten gespalten worden ist. Eine Aufspaltung der Untereinheiten durch Salz wurde z.B. bei Hämoglobin beobachtet.

Die endgültige Klärung des Aufbaus von NF I wird sowohl im menschlichen, als auch Schweineleber-System die Klonierung der zugehörigen Gene bringen.

Für eine sehr stabile Tertiär- bzw. Quartärstruktur von NF I sprechen folgende Argumente: 1. Versuche, NF I mit Proteasen zu verdauen, führten nur mit

vergleichsweise hohen Proteasekonzentrationen zum Erfolg. So gelang es selbst unter denaturierenden Bedingungen nicht, NF I mit V8 Protease zu spalten. Dies kann nicht auf das Fehlen von Glutaminsäureresten zurückgeführt werden, die von der V8 Protease spezifisch erkannt werden. Sowohl aus der Analyse der NF I Aminosäurezusammensetzung als auch aus den Sequenzierungsergebnissen geht hervor, daß NF I solche Reste enthält. Auch nach Collagenase und Arg-C Protease Behandlung zeigt NF I keine Veränderung oder Abnahme des Signals in der Gelretention. Insbesondere wurde keine proteaseresistente Domäne erzeugt, wie dies z.B. für einige prokaryotische Repressoren beobachtet wurde (Ptashne, 1986)

2. Aus der Trennung von NF I über die Phenylsuperose geht hervor, daß dieses Protein viele hydrophobe Bereiche enthält. Die stärkste Kraft, durch die Tertiär- und Quartärstrukturen stabilisiert werden, sind hydrophobe Wechselwirkungen.
3. Der Versuch NF I, direkt anzusequenzieren, scheiterte. Neben einer Modifizierung des N-Terminus kann dies auch durch dessen Unzugänglichkeit begründet sein.

Aus dem chromatographischen Verhalten von NF I auf der Mono P Säule läßt sich schließen, daß dieses Protein basisch, mit einem isoelektrischen Punkt von ca. 8,9, ist. Darin ähnelt NF I vielen anderen Proteinen, z.B. Histonen und Proteinen der heterogenen Kern-RNA-Partikel (hnRNP), die an Nukleinsäuren binden.

Der Versuch die Komplexbildung durch Anwesenheit von $ZnCl_2$ und $MgCl_2$ bzw. EDTA zu beeinflussen führte zu keiner Änderung des Komplexsignals in nativen Gelen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß NF I nicht die für einige Proteine, z.B. den Transkriptionsfaktor SP1, beschriebenen Zinkfinger-Domänen beinhaltet, die an deren Bindung an DNA beteiligt sind. Wie schon in der Einleitung erwähnt, spricht die hohe Symmetrie der NF I Erkennungssequenz und die Wechselwirkungsweise dieses Proteins mit der DNA eher dafür, daß die Bindedomäne von NF I entsprechend dem "Helix turn Helix" Modell aufgebaut ist.

Bisher konnte NF I noch keine enzymatische Funktion zugeordnet werden. Für die Replikation eukaryotischer DNA wird angenommen, daß, neben dem DNA Polymerase α -Primase Komplex und DNA Ligase, die DNA entwindende Faktoren für eine effiziente Replikation essentiell sind. Für die SV40 Replikation wurde von beiden Aktivitäten, Topoisomerase I und II, gezeigt, daß sie das Fortschreiten der Replikationsgabel durch Entwinden der DNA ermöglichen können. Jedoch bewirkt nur Topoisomerase II die Trennung der beiden synthetisierten Tochterstränge (Yang et al., 1987). Vorläufige Versuche gaben keinen Hinweis auf mögliche Topoisomerase I oder II Aktivitäten für

NFI (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls im SV40-System wurde eine weitere Aktivität, die Entwindung des DNA Doppelstrangs, bei der Initiation der Replikation beschrieben. Diese Helikase-Aktivität ist Bestandteil des multifunktionellen T Antigens (Stahl et al., 1986). Möglicherweise übt NF I eine ähnliche Funktion aus. Während NF I an doppelsträngige DNA bindet, interagieren die Adenovirus kodierten Proteine pTP-Pol und DBP präferenziell mit einzelsträngiger DNA. Da diese Proteine zusammen mit NFI und NF III an der Initiation der Replikation beteiligt sind, und da die Bindestellen für pTP pol, NF I und NF III eng benachbart in der ITR liegen, kann eine direkte oder indirekte Interaktion der Faktoren vermutet werden. So wäre es möglich, daß NF I durch Bindung und Entwindung des Doppelstrangs die Interaktion von pTP-Pol und DBP mit der DNA erleichtert. Bisher wurde allerdings keine durch NF I bewirkte Veränderung an DNA-Fragmenten, auch nach Zusatz von ATP, beobachtet.

NF I zeichnet sich durch eine hochspezifische und sehr affine Wechselwirkung mit seiner Erkennungssequenz aus. Zusammen mit der Beobachtung, daß die Zahl der NF I Bindestellen der, der Replikationsstartpunkte entspricht, wäre auch ein Eingreifen von NF I in das "Histon phasing" denkbar. Der Faktor könnte, sofort nach der Replikation potentielle Startpunkte markieren und bei Eintritt der Zellen in die nächste S Phase, in Wechselwirkung mit anderen Faktoren, die Initiation der Replikation stimulieren. So wäre auch ein Vorkommen von NF I in nicht proliferierenden Zellen, z.B. im Gehirn, zu erklären (Huber-Mack, 1987).

Andererseits wäre das Vorkommen von NF I in nicht proliferierenden Geweben auch mit der möglichen Funktion dieses Proteins in der Transkription erklärbar. Dabei könnten die selben cis Elemente, über die auch der Replikationsvorgang abläuft, genutzt werden. In dem neu erschienen Übersichtsartikel von DePamphilis (1988) werden Beispiele für Transkriptionselemente als Komponenten der Ursprungsorte der DNA Replikation in Eukaryoten diskutiert. Es könnte NF I beispielsweise mit "High Mobility Group" Proteinen (HMG Proteinen) interagieren. Diese Gruppe von Proteinen ist durch hohe Mobilität in denaturierenden Gelen und durch häufiges Auftreten im Kern (ca. 3% w/w des Histongewichts) gekennzeichnet. Es wurde beobachtet, daß diese Proteine oft mit transkriptionsaktiven Bereichen der DNA assoziiert sind. (Übersichtsartikel: Johns, 1982). Die bisher am Besten charakterisierten HMG Proteine, HMG 1 und HMG 2, binden präferentiell an einzelsträngige DNA. Für beide Proteine wurde gezeigt, daß sie die Bindung des spezifischen Transkriptionsfaktors MLTF an seine Erkennungssequenz im Adenovirus "Major Late Promoter" stimulieren (Watt und Molloy, 1988). Proteininteraktionen von NF I zu untersuchen, wäre sicherlich ein interessantes Forschungsprojekt, was jetzt, mit gereinigtem NF I, in Angriff genommen werden könnte. Als Ansatzpunkt könnte z.B. eine Säule konstruiert werden, mit einer Matrix an

die kovalent NF I gebunden wird. Interagierende Proteine könnten eluiert und in ihrem Zusammenwirken mit NF I untersucht werden.

Die Sequenzierung von tryptischen- und Bromcyan- Fragmenten von NF I lieferte das nötige Handwerkszeug für die Suche nach dem NF I Gen. Insgesamt konnten 11 Peptide ansequenziert werden. Von einem Peptid ließ sich die Aufeinanderfolge von 16 Aminosäuren hintereinander ermitteln. Es konnten somit bis zu 48 Nukleotide lange DNA-Proben synthetisiert werden für die Durchmusterung von cDNA- und genomische DNA Banken.

Einige der sequenzierten Peptide beinhalten zudem viele geladene Aminosäuren und könnten geeignete Proben zur Erzeugung von gegen NF I gerichteter Antikörper sein. Dies wird für das Peptid D in Figur 5.1. in einem Plot der Hydrophilizität des Peptids verdeutlicht. Eine Immunisierung mit Peptiden erscheint besonders deshalb sinnvoll, da die Versuche, Mäuse mit gereinigtem Protein zu immunisieren, bisher immer zu deren Tod führten. Neben der Möglichkeit, Expressionsbanken mit NF I Antikörpern zu durchmustern, könnten mit Antikörpern auch funktionelle Tests durchgeführt, sowie die cytologische Verteilung dieses Proteins analysiert werden.

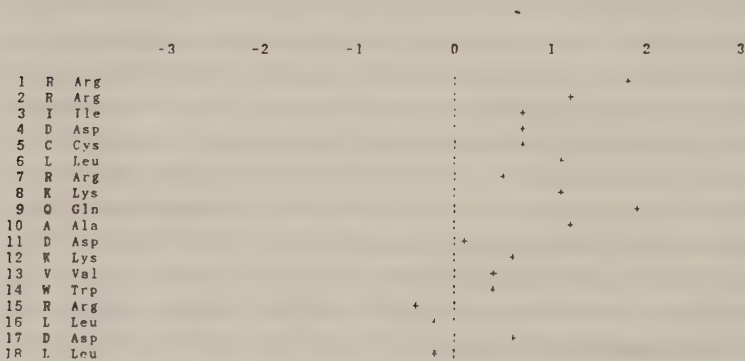


Fig. 5.1. Darstellung der Hydrophilizität von Peptid D.

Die Suche nach übereinstimmenden Aminosäure-Sequenzen zwischen NF I und bekannten Proteinen in den Microgenie Protein- und DNA- Datenbanken, sowie in der EMBO-Proteinsequenz-Datenbank blieb weitgehend erfolglos. Nur für Teile der Peptide E, G und Z konnte eine entfernte Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen festgestellt werden, Fig.5.2. gibt zu über 60% ähnliche Sequenzen an. Keine dieser Sequenzen stammt aus höheren Eukaryonten. Zumeist sind sie auch nicht Bestandteil von DNA bindenden Proteinen. Die Proteinsequenz von NF I ist somit sehr wahrscheinlich völlig neuartig.

Peptid E

V I L F K G I P L E E

F K G I T L E

Mantelprotein des CCM-Virus

I L A K G N P L E

Hypothetisches Protein 4,

Agrobacterium tumefaciens

Peptid G

L T Q D E F H P F I E A A L L P

E F E P F I E

Flavodoxin, *Clostridium* MP.

E F E P F I E

Flavodoxin, *Clostridium* SP.

Peptid Z

L A E L E A

L A E L E

DNA-Polymerase I, *E. coli*

Fig.5.2. Sequenzvergleich von NF I-Peptiden mit Sequenzen aus Datenbanken. Fettgedruckt sin übereinstimmende Aminosäuren.

Das Resultat eines Vergleichs dreier Peptide mit Sequenzen von CTF aus Tjians Arbeitsgruppe ist in Tabelle 5.1. zusammengefaßt. Zwei der Peptide (D und E) stimmten in der Sequenz mit CTF überein. Das Peptid F hingegen war in CTF nicht enthalten. Dies Ergebnis legt nahe, daß die beiden Proteine CTF und NF I miteinander verwandt aber

nicht identisch zueinander sind. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß CTF aus HeLa Zellen und NF I hier aus Schweineleber gereinigt worden ist. Der Sequenzunterschied könnte also auch auf die Gewebe- bzw. Art- Unterschiede zurückzuführen sein. In dem Zusammenhang sei auch erwähnt, daß Leberzellen im Gegensatz zu den HeLa- Kulturzellen nur eine geringe Teilungsaktivität aufweisen. Die Sequenzen der weiteren Peptide wurden nicht verglichen.

	NF I	CTF
Peptid D	R R I D C L R Q A D K V W R L D	✓
Peptid E	I L F K G I P L E	✓
Peptid G	L T Q D E F H P F I E A L L P	-

Tab. 5.1. Partieller Sequenzvergleich von CTF und NF I.

Bisher gibt es keine Hinweise dafür, daß es in Schweineleberkernen eine Familie von NF I ähnlichen Polypeptiden gibt. Weder in nativen noch in denaturierenden Gelen zeigt NF I aus Schweineleber die von Tjian beobachtete Vielfalt von Banden. Ferner wurden keine weiteren Proteine in Rohextrakten entdeckt die an die CTF Erkennungssequenz spezifisch binden (Meisterernst et al., 1988).

In dieser Arbeit wird ein erster Klonierungsansatz für das NF I Gen gezeigt. Auf Grund des anfänglichen Mangels an Aminosäuresequenz-Information, wurde zur Durchmusterung von Expressions-cDNA-Banken die sogenannte South-Western-Technik eingesetzt. Gesucht wird mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe, die die Erkennungssequenz des DNA-bindenden Proteins enthält. Solche Klone, die Bindungsaktivität exprimieren werden selektioniert. Erst in jüngster Zeit wurde diese Methode zur Klonierung eines Enhancer bindenden Proteins von Singh et al. (1988) erfolgreich durchgeführt.

Es wurden eine menschliche- und eine Schweineleber-cDNA-Bank durchmustert und jeweils 20 positive Klone aufgereinigt. Mit einer Mischung positiver Phagen wurde anschließend versucht, in Flüssigkultur DNA-Bindung über den Retentionstest zu zeigen. Spezifische Bindung wurde beobachtet, jedoch erst nach Anreicherung über die NF I Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie. Da der Versuch mit einer Phagemischung durchgeführt worden war, wurden mehrere Banden nach der Gelretention erkennbar.

In Zukunft sollen die Phagen einzeln auf Expression in der Gelretention untersucht werden und Hybridisierungen mit Oligonukleotiden, die inzwischen entsprechend den Aminosäuresequenzen von NF I angefertigt wurden, durchgeführt werden. Bisherige Hybridisierungsversuche verliefen nicht erfolgreich (C. Donath, persönliche Mitteilung), was daran liegen könnte, daß die Bindungsdomäne in der Nähe des 3'-Endes des Gens, und die verwendeten Hybridisierungsproben entfernt davon, in Richtung des 5'-Endes lokalisiert sind.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Charakterisierung und Reinigung eines eukaryotischen Kernproteins aus Schweineleber beschrieben. Dieses ursprünglich aus HeLa-Zellen bekannte Protein, Nuklearfaktor I (NF I), stimuliert die Initiation der Replikation von Adenoviren.

Es wurden Reinigungsstrategien entwickelt, die zu homogenen NF I Präparationen führten. Dazu wurde in der Arbeitsgruppe die Chromatographie über die FPLC-Chromatographie-Anlage etabliert. Um dieses in geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommende Protein stark anzureichern, wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt, die die sequenzspezifische DNA-Bindung dieses Proteins ausnutzen. Der Gelretentionstest wurde zum Reinigungsverfahren umgearbeitet, und Elutionsmethoden wurden entwickelt, die zu nativem und resp. denaturiertem Protein führen. Ferner wurde eine NF I spezifische Erkennungssequenz-Affinitätschromatographie angewendet.

Die Durchführung der Reinigung von NF I im präparativen Maßstab erlaubte die Ansequenzierung des Proteins. Die nun bekannte Peptidsequenz-Information sollte ausreichend sein um das Gen für NF I, mit Hilfe entsprechender Oligonukleotide, zu finden, sei es über Durchmusterung von Genbanken, sei es über die PCR-Reaktion. Einige der Peptide mögen zudem, synthetisch hergestellt, günstige Proben zur Erzeugung von NF I Antikörpern sein.

Es konnte gezeigt werden, daß NF I aus Schweineleber seinem HeLa-Zell-Äquivalent im DNA-Bindungsverhalten entspricht. Sowohl Kompetitionsexperimente als auch Footprint-Analysen führten zu diesem Schluß. Unterschiede zum menschlichen Faktor wurden jedoch im Molekulargewicht und im Bandenmuster der Gelretention festgestellt. Die biochemische Charakterisierung des Proteins zeigte, daß NF I aus Schweineleber ein basisches Protein ist (pK ca. 8,9), mit einem Molekulargewicht von 36 kd. Das Protein enthält sowohl stark hydrophile als auch sehr hydrophobe Bereiche. Es gibt Hinweise aus dem Verhalten dieses Proteins bei der Reinigung, die für dessen Bindung an DNA als Dimer sprechen.

Ein erster Klonierungsansatz wird gezeigt, der die South Western Technik einsetzt. Phagenlysate der aufgereinigten Klone wurden auf Proteine hin getestet, die an das NF I-spezifische Oligonukleotid binden. Nach Reinigung der Extrakte über die NF I spezifische Erkennungssequenz-Affinitätssäule konnten entsprechende Aktivitäten im Gelretentionstest festgestellt werden. Weitere Untersuchungen sind allerdings nötig, um die gefundenen Klone näher zu analysieren.

7. Anhang

Verzeichnis verwendeter Oligonukleotide (sofern nicht im Text angegeben):

myc1	5'-TGCACCTCCCCACCTTCCCCACCTCCCCACCTCCCCAT	
myc2	3'-GGAGGGGTGGAAGGGGTGGGAGGGGTGGGAGGGGTAGATC-5'	
vk1	5'-TCGACTGCTCTCCACCCAACGGGTGGAATCCCCCAGAGGGGGATTCCA	-3'
vk2	3'-GACGAGAGGGTGGGTGCCCCACCTTAGGGGGTCTCCCCCTAAAGGTTCGA-5'	
E1	5'-AATTCGGGGCTTTTGGCACTGTGCCAACTGTGTGTGTTG	-3'
E2	3'-GCCCCGAAAACCGTGACACGGTTGACACAACACAAGTAG-5'	
TK1	5'-GATCCGTCTTGTCATTGGCGAATTCGAACACGCAGATG	-3'
TK2	3'-GCAGAACAGTAACCGCTTAAGCTTGTGCGTCTACAGCT-5'	

Literaturverzeichnis

- Alberts, B.M.; Amodio, F.J.; Jenkins, M.; Gutmann, E.D. and Ferris, F.L. (1968)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 289-305
- Alberts B. and Herrick G. (1971)
DNA-Cellulose Chromatographie
Methods Enzymol. 21, 198-217
- Anderson, W.F.; Ohlendorf, D.H.; Takeda, Y. and Matthews (1981)
Structure of the cro repressor from bacteriophage and its interaction
with DNA
Nature 290, 754-758
- Arndt-Jovin, D.J.; Jovin, T.M.; Bahr, W.; Frischauf, A.-M. and Marquart, M. (1975)
Covalent attachment of DNA to Agarose
Eur. J. Biochem. 54, 411-418
- Barberis, A.; Superti-Furga, G. and Busslinger, M. (1987)
Mutually Exclusive Interaction of the CCAAT-Binding Factor and of a
Displacement Protein with Overlapping Sequences of a Histone Gene
Promoter
Cell 50, 347-359
- Benoist, C.; O'Hare K.; Breathnach R.; Chambon, P. (1980)
The ovalbumin gene sequence of putativ control
Nucl. Acids Res. 8, 127-14
- Berg, J.M.; (1986)
More Metal-binding fingers,
Nature, 319, 264-265
- Borgmeyer, U.; Nowock, J. and Sippel A.E. (1984)
The TGGCA-binding protein: a eukaryotic nuclear protein
recognizing a symmetrical sequence on double-stranded DNA
Nucl. Acids Res. 12, 4295-4311
- Bradford, M.M. (1976)
A Rapid and Sensitiv Method for the Quantitation of Microgram
Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding
Anal. Biochem: 72, 248-254
- Bram, R.J. and Kornberg, R.D. (1987)

Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* centromere DNA-binding protein, its human homolog, and its possible role as a transcription factor

Mol. Cell. Biol. 7, 403-409

Brandt, J. (1977)

Affinity Labelling of Binding Sites in Proteins by Sensitized Photooxidation

Methods Enzymol. 46, 561-582

Briggs, M.; Kadonaga, J.; Bell, S. and Tjian, R. (1986)

Purification and biochemical characterization of the promotor-specific transcription factor, Sp1

Science 234, 47-52

Buchman, A.R.; Kimmerly, W.J.; Rine, J. and Kornberg, R.D. (1988)

Two DNA Binding Factors Recognize Specific Sequences at Silencers, Upstream Activating Sequences, Autonomously Replicating Sequences, and Telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*

Mol. Cell Biol. 8, 210-225

Carthew, R.W.; Chodosh, L.A. and Sharp, P.A. (1985)

An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element of the adenovirus major late promoter

Cell 43, 439-448

Challberg, M.D. and Kelly, T. (1979)

Adenovirus DNA replication in-vitro

Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 655-659

Challberg, M.D. and Rawlins D.R. (1984)

Template requirements for the initiation of adenovirus DNA replication

Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 100-104

Charnay, P.; Mellon, P.; Maniatis, T. (1985)

Linker scanning mutants of the 5' flanking region of the mouse β -major globin gene: sequence requirements for transcription in erythroid and non-erythroid cells

Mol. Cell Biol. 5, 1498-1511

Chodosh, L.A.; Carthew, R.W. and Sharp, P.A. (1986)

A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor

Mol. Cell. Biol. 6, 4723-4733

- Chodosh, L.A.; Baldwin, A.S.; Carthew, R.W. and Sharp, P.A. (1988a)
Human CCAAT Binding Proteins Have Heterologous Subunits
Cell, im Druck
- Chodosh, L.A.; Olesen, J.; Hahn, S.; Baldwin, A.S.; Guarente, S. and Sharp, P.A. (1988b)
A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits, that are functionally interchangeable
Cell, im Druck
- Cohen, R.B.; Sheffrey, M. and Kim, C.G. (1986)
Partial purification of a nuclear protein that binds to the CCAAT box in the mouse α 1-globin gene
Mol. Cell. Biol. 6, 821-832
- DePamphilis, M.L., (1988)
Transcriptional Elements As Components of Eukaryotic Origins of DNA Replication
Cell 52, 635-638
- Dierks, P.; van Ooyen, A.; Cochran, M.D.; Dobkin, C.; Reiser, J. and Weissmann, C. (1983)
Three regions upstream of the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit β -globin gene in mouse 3T6 cells
Cell 32, 695-706
- Diffley, J.F. and Stillman, B. (1986)
Purification of a Cellular, Double-Stranded DNA-Binding Protein Required for Initiation of Adenovirus DNA Replication by Using a Rapid Filter-Binding Assay
Mol. Cell Biol., 6, 1363-1373
- Dorn, A.; Bollekens, J.; Staub, A.; Benoist, C. and Mathis, D. (1987)
A Multiplicity of CCAAT Box-Binding proteins
Cell 50, 863-872
- Dynan, W.S. and Tjian, R. (1985)
Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins
Nature, 316, 775-778
- Efstratiadis, A.; Posakony, J.W.; Maniatis, T.; Lawn, R.M.; O'Connell, C.; Spritz, R.A.; DeRiel J.K.; Forget, B.G.; Weissman, S.M.; Slightom, J.L.; Blechl, A.E.; Smithies, O.; Baralle, F.E.; Shoulders, C.C. and Proudfoot, N.J. (1980)

- The structure and evolution of the human β -globin gene family
Cell 21, 653-668
- Folkmanis, A.; Takeda, Y.; Simuth, J.; Gussin, G.; Echols, H. (1976)
Purification and properties of a DNA-binding protein with
characteristics expected for the Cro protein of bacteriophage λ , a
repressor essential for lytic growth
Proc. Natl. Acad. Sci., 73, 2249-2253
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981)
Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interaction by
polyacrylamid gel electrophoresis
Nucl. Acids Res. 9, 6505-6524
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1984)
Equilibrium Studies of the cyclic AMP Receptor Protein-DNA
Interaction
J. Mol. Biol. 172, 241-262
- Fütterer, J. and Winnacker, E.-L. (1984)
Adenovirus DNA replication
Current Topics in Microbiology and Immunology 111, 41-64
- Galas, D.J. and Schmitz A. (1978)
DNase footprinting: a simple method for the detection of protein DNA
binding specificity
Nucl. Acids Res. 5, 3157-3163
- Gehring, J.W. (1985)
The Homeo Box: A key to the understanding of development?
Cell 40, 3-5
- Gilbert W. and Müller-Hill B. (1970)
The lactose repressor
In J. R. Beckwith und D. Zipser (ed) The Lactose operon. Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Graves, B.J.; Johnson, P.F.; and McKnight, S.L. (1986)
Homologues Recognition of a Promoter Domain Common to the
MSV LTR and the HSV tk Gene
Cell 44, 565-576
- Griffith, J.; Hochschild, A. and Ptashne, M. (1986)
Nature, 322, 750-752
- Gröger, W. (1985)
Replikation bei Adenoviren

Dissertation, LMU, München

Gronostajski, R.M. (1986)

Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonukleotides

Nucl. Acids Res. 14, 9117-9132

Gronostajski, R.M.; Nagata, K. and Hurwitz, J. (1984)

Isolation of human DNA sequences that bind to nuclear factor I, a host protein involved in DNA replication

Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4013-4017

Gronostajski, R.M.; Adhya, S.; Nagata, K.; Guggenheimer, R.A. and

Hurwitz, J. (1985)

Site-Specific DNA Binding of Nuclear factor I: Analysis of cellular Binding Sites

Mol. Cell. Biol. 5, 964-971

Guggenheimer, R.A.; Stillman, B.W.; Nagata, K.; Tamanoi, F. and Hurwitz, J. (1984)

DNA sequences required for the in-vitro replication of adenovirus DNA

Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 3069-3073

Hay, R.T. (1985)

The origin of adenovirus DNA replication: minimal sequence requirement in vivo

EMBO 4, 421-426

Hennighausen, L.; Siebenlist, U.; Danner, D.; Leder, P.; Rawlins, D.;

Rosenfeld, P. and Kelly, T. (1985)

High-affinity binding site for a specific protein in the human IgM gene

Nature, 314, 289-292

Herrik, G. (1980)

Site-specific DNA-affinity chromatography of the lac repressor

Nucl. Acids Res. 8, 3721-3728

Hilleman M.R. and Werner J.H. (1954)

Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 183-188

Holst, A.; Müller, F.; Zentgraf, H.; Schwender, S.; Dinkl, E. and Grummt, F. (1988)

Murine Genomic DNA Sequences Replicating Autonomously in Mouse L Cells

Cell 52, 355-365

- Horwitz, M.S.; Kaplan, L.M.; Abboud, F.; Maritato, J.; Chow, L.T. and Broker, T.R. (1979)
Adenovirus DNA replication in soluble extracts of infected cell nuclei
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 769
- Huber-Mack, A. (1987)
Identifizierung und Charakterisierung von NF I-Bindestellen im Genom des Mausadenovirus AdFL
Dissertation, LMU, München
- Huberman, J.A. (1987)
Eukaryotic DNA Replication: A complex Picture Partially Clarified
Cell, 48
- Jocelyn, P.C. (1987)
Chemical reduction of disulfides
Methods of Enzymol. 143, 246-256
- Johns, E.W., (1982)
The HMG Chromosomal Proteins
Academic Press, London, U.K.
- Johnsen, P.F.; Landschulz, W.H.; Graves, B.J. and McKnight, S. (1987)
Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses
Genes and Development, 1, 133-146
- Jones, K.A.; Kadonaga, J.T.; Rosenfeld, P.J.; Kelly, T. and Tjian, R. (1987)
A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication
Cell, 48, 79-89
- Kadonaga, J.T. and Tjian, R. (1986)
Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins
Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 1-5
- Knight, G.B.; Gudas, J.M. and Pardee, A.B. (1987)
Cell-cycle-specific interaction of nuclear DNA-binding proteins with a CCAAT sequence from the human thymidine kinase gene
Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 8350-8354
- Leammli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 227, 680-685
- Lee, W.; Haslinger, A.; Karin, M. and Tjian, R. (1987)

Activation of transcription by two factors that bind promotor and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV 40
Nature, 325, 368-372

Lee, W.; Mitchell, P. and Tjian, R. (1987)

Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements
Cell, 49, 741-751

Leegwater, P.A.J.; van Driel, W. and van der Vliet, P.C. (1985)

Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific DNA binding protein from HeLa cells, that stimulates adenovirus DNA replication
EMBO, 4, 1515-1521

Leegwater, P.A.J.; van der Vliet, P.C.; Rupp, R.A.W.; Nowock, J. and Sippel, A.E. (1986)

Functional homology between the sequence-specific DNA-binding proteins nuclear factor I from HeLa cells and the TGGCA protein from chicken liver
EMBO, 5, 381-386

Lewin, B.M. (1980)

Gene Expression 2, Wiley, NY, 2nd Ed.

Li, J.J.; Kelly T.J.; (1984)

Simian virus 40 DNA replication in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6973-6977

Lou, M.F.; Poulsen, L.L.; Ziegler, D.M. (1987)

Cellular Protein-mixed Disulfides
Methods Enzymol. 143, 124-129

Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982)

Molecular cloning. A laboratory manual
 Cold Spring Harbour Laboratory, New York

McKnight, S.L.; Kingsbury, R.C.; Spence, A. and Smith, M. (1984)

The distal transcription signals of the herpesvirus tk gene share a common hexanucleotide control sequence
Cell 37, 253-262

McKnight, S. and Tjian, R. (1986)

Transcriptional Selectivity of Viral Genes in Mammalian Cells
Cell, 46, 795-805

Meisterernst, M.; Gander, I.; Rogge, L. and Winnacker, E.-L. (1988)

A quantitative analysis of nuclear factor I/ DNA interactions

Nucleic Acid Res., im Druck

- Mellon, P.; Parker, V.; Gluzman, Y. and Maniatis, T. (1981)
Identification of a DNA sequence required for transcription of the human $\alpha 1$ globin gene in a new SV40 host-vector system
Cell 27, 279-288
- Miksicek, R.; Borgmeyer, U. and Nowock, J. (1987)
Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus
EMBO, 6, 1355-1360
- Myers, R.M.; Tilly, K. and Maniatis, T. (1986)
Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter
Science 232, 613-618
- Nagata, K.; Guggenheimer, R.A.; Enomoto, T.; Lichy, J.H. and Hurwitz, J. (1982)
Adenovirus DNA-replication in-vitro: Identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex
Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 6438-6442
- Nagata, K.; Guggenheimer, R.A. and Hurwitz, J. (1983)
Adenovirus DNA replication *in vitro* Synthesis of full length DNA with purified proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4266-4270
- Nowock, J.; Borgmeyer, U.; Püschel, A.W.; Rupp, R.A.W. and Sippel, A.E. (1985)
The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer.
Nucl. Acids Res. 12, 4295-4311
- Oren, M.; Winogour, E. and Prives, C. (1980)
Differential affinities of SV 40 large tumor antigen for DNA (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 220-224
- Pabo, C.O.; Krowatin, W.; Jeffrey, A. and Sauer, R.T. (1982)
The N-terminal arms of λ repressor wrap around the operator DNA
Nature 298, 441-443
- Pirrotta, V. and Ptashne, M. (1969)
Isolation of the 434 phage repressor.
Nature, 222, 541-544
- Poonian, M.S.; Schlabach, A.J. and Weissbach, A. (1971)
Covalent attachment of nucleic acids to agarose for affinity chromatography
Biochemistry, 10, 424-427

- Pruijn, G.J.M.; van Driel, W.; van Miltenburg, R.T. and van der Vliet, P.C. (1987)
Promoter and enhancer elements containing a conserved sequence motif
are recognized by nuclear factor III, a protein stimulating adenovirus
DNA replication
EMBO 6, 3771-3778
- Ptashne, M. (1967a)
Isolation of the λ phage repressor.
Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 306
- Ptashne, M (1967b)
Specific binding of λ phage repressor to λ DNA.
Nature 214, 232
- Ptashne, M.(1986)
Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance
Nature, 322, 697-701
- Ptashne, M.(1986)
A genetic switch
Cell & Blackwell Scientific Press, Cambridge and Palo Alto
- Pruijn, G.J.M.; van Driel, W. and van der Vliet, P.C. (1986)
Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein
from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication
Nature, 322, 656-659
- Rawlins, D.R.; Rosenfeld, P.J.; Wides, R.J.; Challberg, M.D. and Kelly, T. (1984)
Structure and Function of the Adenovirus Origin of Replication
Cell, 37, 309-319
- Rekosh D.M.K., Russel, W.C., Bellet A.J.D. and Robinson A.J. (1977)
Identification of a protein linked to the ends of Adenovirus DNA
Cell 11, 283-295
- Riggs, A.D.; Reiness, G.; Zubay, G. (1971)
Purification and DNA binding properties of the catabolite activator
protein
Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 1222-1225
- Riggs, A.D. und Bourgeois, S. (1968)
On the assay, isolation and characterisation of the lac repressor
J. Mol. Biol., 34, 361-365
- Rijnders, A.W.M.; van Berge, B.G.M.; van der Vliet, P.C. and Sussenbach, J.M.
(1983)

Specific binding of adenovirus terminal protein precursor-DNA
polymerase complex to the origin of DNA replication
Nucleic Acid Res. 11, 8777-8789

Rosenfeld, P.J. and Kelly, T. (1986)

Purification of nuclear factor I by recognition site affinity
chromatography
J. of Biol. Chem. 261, 1398-1408

Rosenfeld, P.J.; O'Neill, E.A.; Wides, R.J. and Kelly, T. (1987)

Sequence-Specific Interactions between Cellular DNA-Binding
Proteins and the Adenovirus Origin of DNA Replication
Mol. Cell Biol. ,7, 875-886

Rossi, P.; Karsenty, G.; Roberts, A.B.; Roche, N.S., Sporn, M.B. and de
Crombrughe (1988)

A Nuclear Factor I Binding site Mediates the Transcriptional Activation
of a Type I Collagen Promoter by Transforming Growthfactor- β
Cell 52, 405-414

Rowe W.P.; Huebner, R.J.; Gillmore L.K.; Parrot, R.H. and Wardt T.G. (1953)

Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing
spontaneous degeneration in tissue culture
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 570-573

Sawadago, M. and Roeder, R.G. (1985)

Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus
major late promoter upstream of the TATA box region
Cell 43, 165-175

Schneider, R.; Gander, I.; Müller, U.; Mertz, R. and E.-L. Winnacker (1986a)

A sensitiv and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other
DNA-binding proteins in crude nuclear extracts
Nucl. Acids Res. 14, 1303-1317

Schneider, R.; Dörper, T.; Gander, I.; Mertz, R. und Winnacker, E.-L. (1986)

A sensitive and rapid assay for DNA-binding proteins exemplified by a
functional analysis of the inverted terminal repetition of Adenovirus
DNA
Cancer Cells 4, 477-483

Shore, D.; Stillman, D.J.; Brand A.; Nasmyth, K.A. (1987)

Identification of silencer binding proteins from yeast: possible roles in
SIR control and DNA replication
EMBO 6, 461-467

- Singh, H.; LeBowitz, J.H.; Baldwin A.S. J. and Sharp, J. and P.A. Sharp
Molecular Cloning of an Enhancer Binding Protein; Isolation by
Screening of an Expression Library with a Recognition site DNA
Cell 52, 415-423
- Sippel, A.E.; Fritton, H.; Theisen, M.; Borgmeyer, U.; Strech-Jurk, U.; Igo-Kemenes,
T. (1986)
The TGGCA protein binds *in vitro* to DNA contained in a nuclease
hypersensitive region that is present only in active chromatin of the
lysosome gene
In Grodzicker, T.; Sharp, P.A. and Botchan, M.R.(eds.). Cancer Cells
4, DNA tumor viruses: Gene Expression and Replication, CSHL Press,
N. Y.
- Stahl, H.P.; Dröge, P. and Knippers, R. (1986)
DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen.
EMBO 5, 1939-1944
- Stillman, B.W.; Tamanoi, F. and Mathews, M.B. (1982)
Purification of an Adenovirus-Coded DNA Polymerase that is
Required for Initiation of DNA Replication
Cell, 31, 613-623
- Stillman, B.W. (1983)
The replication of adenovirus DNA with purified proteins
Cell 35, 613-623
- Takeda, Y.; Ohlendorf, D.H.; Anderson, W.F. and Matthews, B.W. (1983)
DNA binding proteins
Science 221, 1020-1026
- Tamanoi, F. and Stillman, B.W. (1983)
The origin of Adenovirus DNA replication
Current Topics of Microbiology and Immunology 109, 75-87
- van der Vliet, P.C.; van Dam, D. and Kwant, M.M. (1984)
Adenovirus DNA replication *in vitro* is stimulated by RNA from
uninfected HeLa cells
FEBS letters 17, 5-8
- de Vries, E.; van Driel, W.; Tromp, M.; van Boom, J. and van der Vliet, P.C. (1985)
Adenovirus DNA replication *in vitro*: site-directed mutagenesis of the
nuclear factor I binding site of the Ad2 origin
Nucl. Acids Res. 13, 4935-4952
- de Vries, E.; van Driel, W.; van den Heuvel, S.J.L. and van der Vliet, P.C. (1987)

Contactpoint analysis of the HeLa nuclear factor I recognition site
reveals symmetrical binding at one side of the DNA helix
EMBO, 6, 161-168

Watt, F. and Molloy, P.L. (1988)

High mobility group proteins 1 and 2 stimulate binding of a specific
transcription factor in the adenovirus major late promotor
Nucl. Acids Res. 16, Nr. 4, 223-239

Wides, R.J.; Challberg, M.D.; Rawlins, D.R. and Kelly, T. (1987)

Adenovirus origin of replication: Sequence requirements for
replication in-vitro
Mol. Cell. Biol., 7, 864-874

Wu, B.J.; Williams, G.T. and Morimoto, R.I. (1987)

Detection of three protein binding sites in the serum-regulated promoter
of the human gene encoding the 70 kDa heat shock protein
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 2203-2207

Lebenslauf

Name	Irene Gander
Geburtsdatum	28.5.1958
Geburtsort	Hamburg
Eltern	Dr. Karl-Friedrich Gander Gisela Gander, geb. Rhaese
1965-1969	Grundschule in Hamburg
1969-1977	Gymnasium Hochrad in Hamburg
1977	Abitur
1978-84	Biologie-Studium an der Universität Konstanz
1980	Diplomvorprüfung
1983	Diplomhauptprüfung
4.1983-3.1984	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. B. Wurster im Fachbereich Biologie der Universität Konstanz
8.1984-12.1987	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Universität München

